

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1934-1935

N° 5

RECHERCHES SUR LES STÉROLS

ET

LA LEVURE DE BIÈRE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 19 décembre 1934

PAR

Jacques GALIMARD

Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris
Ancien interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. FABRE, *Président*
 HÉRISSEY, *Professeur*
 FLEURY, *Agrégé.*

PARIS

HERMANN & C^{ie}, ÉDITEURS

6, rue de la Sorbonne

1934

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1934-1935

N° 5

RECHERCHES SUR LES STÉROLS
ET
LA LEVURE DE BIÈRE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 19 décembre 1934

PAR

Jacques GALIMARD

Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris
Ancien interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. FABRE, *Président*,
HÉRISSEY, *Professeur*.
FLEURY, *Agrégé*.

PARIS

HERMANN & C^{ie}, ÉDITEURS

6, rue de la Sorbonne

1934

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O. ✱, ① I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ① I.
P. DESPORT, *Secrétaire*, ✱, ① I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O. ✱, ① I.	Botanique générale.
PERROT, O. ✱, ① I.	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, O. ✱, ① I.	Zoologie.
LEBEAU, O. ✱, ① I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, ✱, ① I.	Chimie analytique.
GORIS, O. ✱, ① I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. ✱, ① I.	Physique.
DAMIENS, ✱, ① I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. ✱, ① I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ① I.	Chimie organique.
LUTZ, O. ✱, ① I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ① I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ① I.	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ① I.

Professeurs honoraires : MM. BÉHAL, G. O. ✱, ① I. et DELÉPINE, O. ✱, ① I.
membres de l'Institut, et GUERBET, ✱, ① I.

CHARGÉS DE COURS

MM. MARC HONNORAT, ✱, ① I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. ✱, ① I.	Pharmacodynamie.
DELABY, ✱, ① I.	Hydrologie et Hygiène.
PICON, ① I.	Minéralogie.
BACH, ① I.	Microbiologie.
FLEURY, ① I.	Chimie organique.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, ✱, ① A. PICON, ① I.	MM. MASCRÉ, ① I. FLEURY, ① I. BACH, ① I.	MM. BEDEL, ① I. RÉGNIER, ① I.
------------------------------------	--	----------------------------------

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ① I., agrégé, chargé des T. P. de 1 ^{re} année.	Chimie générale.
FLEURY, ① I. et RÉGNIER, ① I. : agrégés, chargés des travaux de	Chimie analytique.
SOUÈGES, ① I.	Micrographie.
LEROUX, ① I.	Physique.
DEVAL, ✱, ① I.	Microbiologie.
DELABY, ✱, ① I., PICON, ① I. et MASCRÉ, ① I. : agrégés, chargés des Travaux généraux de 4 ^e année,	

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ① I.



A MON PÈRE

A MA MÈRE

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. FABRE

Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien en chef du Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades
Chevalier de la Légion d'honneur

*En remerciements sincères pour l'affectueuse
sollicitude et les conseils de tous ordres qu'ils
nous a prodigués durant notre travail.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR H. HERISSEY

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien en chef de l'Hôpital Saint-Antoine
Officier de la Légion d'honneur

*En témoignage de notre profonde gratitude
pour toute la bienveillante sympathie avec
laquelle il a bien voulu examiner cette thèse.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ P. FLEURY

Pharmacien en chef de l'Asile de Villejuif

*Pour toute la bienveillance avec laquelle
il a accepté de faire partie de notre jury.*

A MONSIEUR H. PENAU

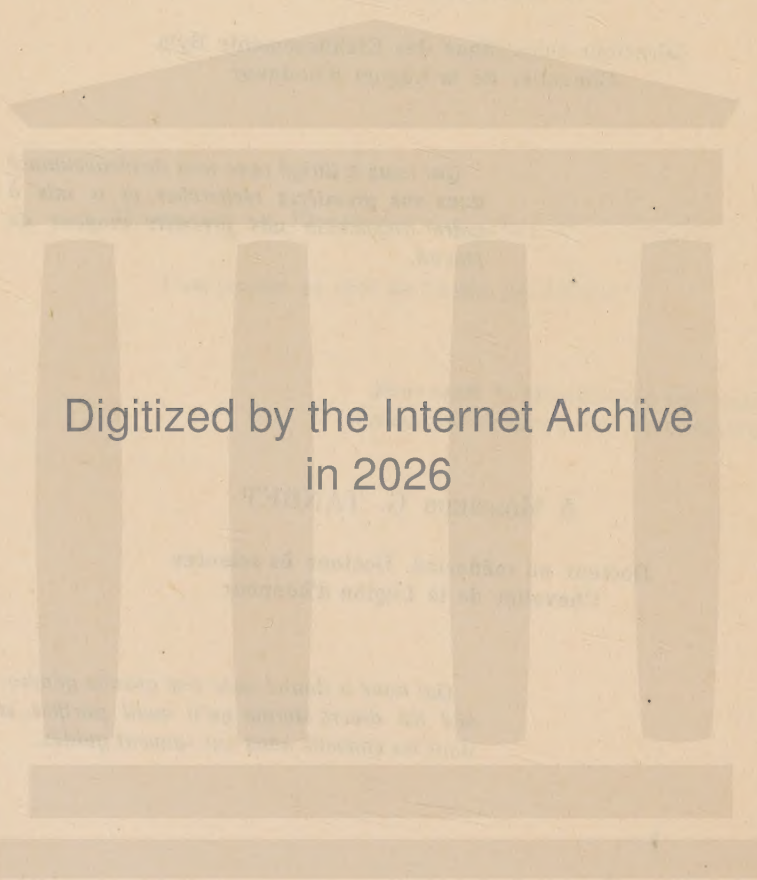
Directeur scientifique des Etablissements Byla
Chevalier de la Légion d'honneur

*Qui nous a dirigé avec tant de bienveillance
dans nos premières recherches, et a mis à
notre disposition nos premiers moyens de
travail.*

A MONSIEUR G. TANRET

Docteur en médecine. Docteur ès sciences
Chevalier de la Légion d'honneur

*Qui nous a donné avec une grande généro-
sité les divers stérols qu'il avait purifiés, et
dont les conseils nous ont souvent guidés.*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

RECHERCHES SUR LES STÉROLS ET LA LEVURE DE BIÈRE

INTRODUCTION

Nous nous sommes proposé principalement de chercher une technique pratique d'extraction des stérols à partir de la levure de bière et, l'historique de l'extraction de ces stérols fera l'objet des premiers paragraphes de cette introduction. Nous décrirons ensuite sommairement une des expériences qui nous ont poussé à faire les recherches dont l'exposé rapide termine cet avant-propos.

Depuis la découverte de l'ergostérol dans l'ergot de seigle par C. TANRET (102), GÉRARD (32), le premier, a isolé ce corps d'un autre organisme vivant, la levure de bière. Sa technique pouvait se résumer en quelques lignes : il délayait la levure de bière humide dans une grande quantité d'alcool à 96°, essorait, desséchait à 40-50°, additionnait de sable lavé et lessivait à l'éther sec. Le résidu provenant de la distillation alcoolique était aussi épuisé à l'éther. Mais GÉRARD remarquait déjà, comme Von NAEGELI et O. LEW pour les corps gras, que l'épuisement à l'éther de la levure desséchée était bien loin d'être complet, même après traitement par l'alcool.

Puis HINSBERG et ROSS (55), NÉVILLE (77) retirent aussi de l'ergostérol de la levure, mais, après GÉRARD, le travail le plus important concernant cette question des stérols est celui de WINDAUS et GROSSKOPF (117). Les auteurs allemands introduisent la saponification des constituants de la levure par l'alcool sodé bouillant et leur technique comprend dans ses grandes lignes les opérations suivantes : épuisement de la levure par une solution sodo-alcoolique puis par l'éther ; épuisement des liquides alcooliques par

l'éther ; acidification et déshydratation de tout l'éther ; évaporation de l'éther et purification de l'ergostérol.

REINDEL, WALTER et RAUCH (84) partent de la graisse de levure qu'ils traitent par la potasse alcoolique, à froid et par agitation.

BILLS, MASSENGALE et PRICKETT (5), les premiers, disent la nécessité d'employer un produit poreux et friable et pour cela basent leur technique d'extraction sur : une déshydratation de la levure à l'alcool méthylique, une dessiccation à l'étuve à vide à 75°, une extraction à l'alcool-benzène bouillant.

HEIDUSCHKA (41) simplifie la technique de WINDAUS en évitant l'extraction étherée des solutions savonneuses.

De toutes ces méthodes celle de WINDAUS est la plus pratique et une des meilleures ; c'est elle qui, à quelques variantes près, est employée industriellement. Nous étant proposé de chercher quelle est la technique capable de nous donner la solution extractive la plus riche en stérols, nous avons voulu voir si les méthodes industrielles laissaient des quantités appréciables de ces stérols.

Nous avons donc utilisé de la levure de bière de panification (marque Springer), préalablement épuisée industriellement par l'alcool sodé suivant une technique très voisine de celle de WINDAUS et GROSSKOPF.

Dans une expérience type, nous avons pisté 7 grammes de levure préalablement épuisée et 18 grammes de plâtre.

Quatre grammes de ce mélange ont été pulvérisés et introduits avec 20 cm³ de chloroforme dans un flacon bouché que nous avons soumis 5 heures environ à l'agitation mécanique.

Les stérols passés dans le chloroforme ont été évalués au colorimètre en utilisant la classique réaction colorée de LIEBERMANN (anhydride acétique : 2 cm³, solution chloroformique : 2 cm³, acide sulfurique pur 66° B : II gouttes). La comparaison faite avec une solution chloroformique au 1/1.000 d'ergostérol a donné 3 mgr. 5 d'ergostérol pour la prise d'essai (1 gr. 12 de levure épuisée) soit 0,3 % d'ergostérol.

Ces chiffres ne prétendent pas atteindre à la rigueur scientifique. Ils permettent seulement de dire : la levure, épuisée industriellement par la technique de WINDAUS, contient encore des quantités appréciables de stérols.

Les méthodes ordinaires ne retiraient donc pas tous les stérols de la levure et il nous a semblé intéressant de reprendre cette étude.

Pour mener à bien les quelques recherches que nous allions entreprendre, il nous fallait une méthode simple et rapide de dosage du bloc des stérols extraits de la levure. Nous ne pouvions songer en effet à traiter des centaines de kilogrammes de levure pour en isoler les différents stérols qui y sont contenus. Leur nombre est très élevé, au moins égal à 9, sans compter les isomères, d'après les récents travaux de WINDAUS, WIELAND et leurs collaborateurs. Aussi dans le chapitre premier nous occuperons-nous de la bibliographie des stérols, de leurs réactions colorées et d'une critique de leurs modes de dosage.

Dans le second chapitre, nous étudierons l'action des divers solvants sur la levure de bière fraîche et la levure de bière sèche.

Enfin, le troisième chapitre comprend l'exposé des techniques spéciales, établies en vue d'une extraction totale des stérols de la levure, et nous avons borné nos recherches à l'obtention de la solution extractive la plus riche en stérols totaux.

Incidemment, nous avons cherché dans quelle région de la cellule : noyau, protoplasme, membrane, se trouvent ces stérols et leurs relations avec la teneur en lécithides ou en phosphore dans les différents extraits obtenus. Ce sont ces résultats qui, au lieu d'être épars dans les chapitres précédents, ont été rassemblés dans le quatrième et dernier chapitre.

Nous ne voudrions pas terminer cette courte introduction sans remercier les établissements Byla, et en particulier MM. H. PÉNAU et G. TANRET, qui ont si affectueusement guidé nos premiers pas et nous ont procuré avec une grande générosité nos éléments de travail. Et, nous n'oublions pas tout ce que nous devons à notre maître, le professeur R. FABRE, qui fut avec nous dans tous les instants et dont la parfaite connaissance de la question des stérols nous évita bien des erreurs.

CHAPITRE I

Les stérols de la levure de bière.

PLAN : A. — Les stérols ;
B. — Leurs réactions colorées ;
C. — Leurs dosages.

Cherchant à obtenir à partir de la levure de bière la solution extractive la plus riche en stérols totaux il nous fallait connaître ces stérols et ce sera l'exposé du premier paragraphe.

Pour pouvoir dans nos recherches ultérieures, apprécier des traces de stérols, la connaissance de leurs réactions colorées avec leurs limites de sensibilité nous était indispensable et cela sera le sujet du deuxième paragraphe.

Enfin, dans le troisième paragraphe nous nous occuperons d'un mode de dosage rapide et suffisamment précis des stérols dans nos solutions extractives.

A. — LES STÉROLS

On a cru pendant longtemps que l'ergostérol isolé par GÉRARD (32, 33, 34) était le seul stérol de la levure de bière, mais depuis quelques années nos connaissances font sur ce sujet de rapides progrès.

En 1928 presque simultanément SMEDLEY MAC LEAN en Angleterre (100), H. PENAU (81) et G. TANRET en France isolent un autre stérol bien défini, dextrogyre : le zymostérol dont R. FABRE et H. SIMONNET (25) font l'étude physique et biologique.

BILLS et HONEYWELL (3) parlent, sans plus insister, d'un stérol lévogyre fondant à 240° : le cérévistérol.

En 1929 H. WIELAND et M. ASANO, étudiant les résidus de préparation de l'ergostérol de levure, découvrent trois stérols (113) : le néostérol, l'ascostérol et le faecostérol.

H. WIELAND et G. GOUCH donnent les caractéristiques de trois nouveaux stérols (114) : l'épistérol, l'anastérol et l'hypostérol.

Enfin récemment H. WIELAND et V. STANLEY décrivent un Kryptostérol (115).

Si nous voulions aborder l'étude complète de ces stérols, de leurs isomères et de leurs esters, il nous faudrait un fort volume et cela sortirait du cadre que nous nous sommes imposé, aussi nous contenterons-nous de l'exposé de leurs principales propriétés.

Ergostérol.

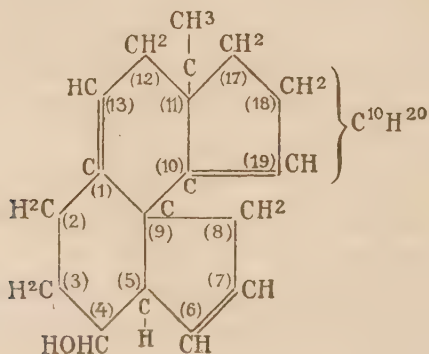
FORMULES.

Cristallisé dans l'alcool à 95° bouillant, ou l'éther hydraté chaud, l'ergostérol répond à la formule : $C^{27}H^{42}O$, H^2O . Il n'est pas efflorescent et ne se déshydrate complètement qu'à 105° ; il a alors pour formule : $C^{27}H^{42}O$.

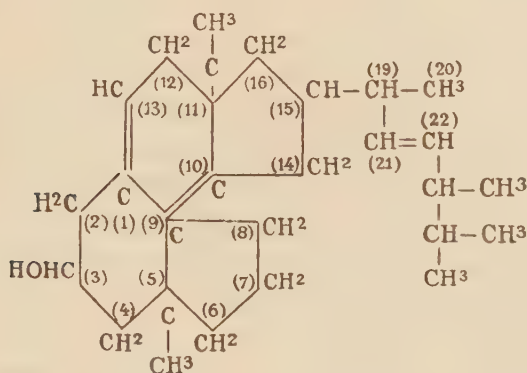
Cette formule semblait sûre et définitivement établie par les très nombreux expérimentateurs qui ont étudié cette importante question. Mais des analyses récentes effectuées par WINDAUS et ses collaborateurs font croire que la formule $C^{27}H^{42}O$ doit être remplacée par la formule $C^{28}H^{44}O$ plus riche en carbone que la précédente (123).

Quoi qu'il en soit, les faits principaux suivants peuvent servir à l'établissement d'une formule développée : l'ergostérol est un alcool non saturé possédant trois doubles liaisons, le groupement alcool est secondaire et appartient à un noyau hydroaromatique, le squelette de la molécule est formé de quatre anneaux cycliques, à l'intérieur desquels se trouvent deux des doubles liaisons, et d'une chaîne latérale en C^9 contenant la troisième double liaison (105).

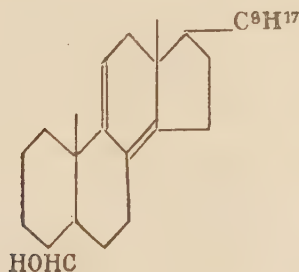
HEILBRON et SPRING (48) ont proposé la formule développée suivante :



D'autres auteurs ont donné des formules plus complètes telles que celle ci-dessous que reproduit G. TANRET (105) : elle met en relief les nombreuses possibilités d'isoméries de l'ergostérol.



Enfin, les derniers travaux de WINDAUS et ses collaborateurs permettent de représenter la chaîne carbonée par un schéma tel que celui ci-contre (123). Pour un élève de WINDAUS, CHUANG, le groupement *CHOH* serait en 3.



Signalons également que DIELS et KARTENS (16'), utilisant leur méthode de déshydrogénation au moyen du sélénium, ont pu obtenir un carbure $C^{18}H^{16}$ à partir de l'ergostérol et du cholestérol, ce qui ferait admettre une similitude de forme du squelette moléculaire de ces deux stérols.

ETATS NATURELS.

L'ergostérol doit son nom à l'ergot de seigle (sclérote du *Claviceps purpurea*, champignon pyrénomycète) d'où C. TANRET l'a isolé le

premier en 1889 (102). G. TANRET a pu l'extraire en proportion quatre à six fois plus élevée de l'ergot d'autres graminées (ergots de diss et d'avoine) (104).

Il semble bien que l'ergostérol soit réparti d'une façon absolument générale dans tout le règne animal, comme le montre les quelques exemples suivants pris sur des sujets très divers : les recherches de KUSTER et HIRTH ont mis l'ergostérol en évidence dans le sang de bœuf (62) ; DEJUST et ses collaborateurs l'ont reconnu dans l'insaponifiable de sang humain (15) ; MOURIQUAND et LEULIER l'ont décelé chez l'escargot ; enfin, en étudiant la genèse du principe antirachitique dans la nature, R. FABRE et ses collaborateurs ont caractérisé l'ergostérol et l'ergostérol irradié dans le plankton de la sardine (27).

Mais il semble bien que ce soient les levures qui contiennent la plus grande quantité d'ergostérol soit à l'état libre, soit à l'état combiné. Elles constituent la matière première actuelle pour la préparation de l'ergostérol et nous allons résumer les principaux résultats obtenus par les auteurs qui se sont occupés de l'extraction de l'ergostérol à partir des levures.

Notons tout d'abord que les méthodes très diverses employées par les différents expérimentateurs pour doser l'ergostérol et les stérols dans les levures, ne permettent pas de comparer leurs chiffres et ceux-ci ne doivent être examinés qu'accompagnés de leurs références.

Pour S. MAC LEAN, la levure de bière sèche contient environ 3 % de matières grasses, celles-ci sont constituées d'environ 40 % d'insaponifiable contenant 5 % de stérols libres, 5 % et 12 % de stérols combinés (IDA-SMEDLEY MAC LEAN, DAUDNEY et I. SMEDLEY MAC LEAN) (14).

H. PÉNAU et G. TANRET retirent 5 gr. 3 environ d'ergostérol par kilogramme de levure sèche, après séparation du zymostérol (3 gr. 5 environ de zymostérol) (81).

HEIDUSCHKA par colorimétrie trouve jusqu'à 11 gr. 7 d'ergostérol par kilogramme de levure sèche, mais la méthode dose ensemble ergostérol et zymostérol (40). Notons que par la même méthode colorimétrique nous sommes parvenu à 20 gr. 4.

Enfin, C. BILLS, N. MASSENGALE et P. PRICKETT, par dosages spectrophotométriques, se sont préoccupés de la teneur en ergostérol de différentes levures. Celles-ci en contiendraient depuis des traces

dans le *Saccharomyces logos*, jusqu'à 2 % dans le *Saccharomyces Carlsbergensis*. Pour le *Saccharomyces cerevisiae*, leurs chiffres oscillent entre 0,2 et 1,4 % (5).

PRÉPARATION DE L'ERGOSTÉROL.

I. *A partir de l'ergot de seigle par la technique de C. Tanret (102).*

Cette préparation est la première en date et c'est elle qui permit à C. TANRET de découvrir l'ergostérol.

L'auteur épuise le seigle ergoté par plusieurs fois son poids d'alcool ; puis après distillation il lave à l'éther l'extrait obtenu. La liqueur éthérée distillée à son tour, laisse comme résidu une masse huileuse remplie de fins cristaux. C. TANRET essore à la trompe, puis purifie les cristaux par plusieurs cristallisations, d'abord dans de l'alcool alcalin pour saponifier l'huile qui les souille, ensuite dans de l'alcool pur. Le rendement est d'environ 0,2 %.

II. *A partir des levures.*

a) TECHNIQUE DE GÉRARD (33). — GÉRARD délaye la levure de bière humide dans une grande quantité d'alcool à 96°, il essore et dessèche entre 40 et 50°. Il additionne le résidu de sable lavé et lessivé à l'éther sec. D'un autre côté, il distille la liqueur composée d'alcool étendu (par suite de la déshydratation de la levure) et agite la solution aqueuse restante avec de l'éther. Il rassemble les solutions éthérées et les distille. Il obtient ainsi un résidu brunâtre qu'il traite par l'éther de pétrole bouillant au-dessous de 65°.

L'éther de pétrole s'empare de l'ergostérol et de la matière grasse. Après évaporation du solvant, GÉRARD saponifie la matière grasse. par la potasse alcoolique (2 h. au B. M.), il distille l'alcool et dissout le savon obtenu dans de l'eau distillée chaude. Il agite la solution savonneuse avec de l'éther, décante et distille l'éther. Il obtient ainsi un résidu cristallin qu'il dissout dans une petite quantité d'alcool bouillant : l'ergostérol seul passe en solution.

b) TECHNIQUE DE WINDAUS ET GROSSKOPF (117). — Les auteurs allemands donnent la technique suivante :

« Dans un grand mortier de porcelaine de 5 litres environ, malaxez 2 kilogrammes de levure pressée avec 2 litres d'alcool à 95°.

Versez le tout dans un ballon rond de 5 litres et ajoutez 400 grammes d'une solution aqueuse concentrée d'hydroxyde de sodium puis encore un litre d'alcool.

Le mélange chauffé au B. M. pendant 3 heures est versé dans un grand entonnoir de porcelaine. Essorez fortement et réintroduisez le résidu insoluble dans le ballon avec de l'alcool ; faites bouillir et filtrez. Les filtrats alcooliques étant réunis puis concentrés au demi, ajoutez un égal volume d'eau et épuisez trois fois profondément dans une ampoule à décantation de 5 litres avec beaucoup d'éther. Lavez l'extract éthéré jaune d'or avec de l'eau chlorhydrique et séchez au sulfate de sodium anhydre. Dans l'entonnoir en porcelaine se trouve un reste insoluble qui contient encore de l'ergostérol, on l'extract à l'éther par épuisement au Soxhlet. Séchez également les extraits éthérés au sulfate de sodium anhydre.

Rassemblez les solutions éthérées et évaporez au B. M. Elles laissent une huile jaune clair qui se solidifie en une bouillie cristalline à consistance de miel. Dissolvez celle-ci à ébullition aussi modérée que possible dans l'éther de pétrole ; la solution refroidie au mélange réfrigérant abandonne au bout de quelque temps un précipité cristallin blanc qui est essoré, lavé avec de l'éther de pétrole refroidi, et recristallisé dans l'alcool ».

c) **TECHNIQUE DE REINDEL, WALTER et RAUCH (84) (85).** — Ces auteurs évitent l'action de la chaleur. Ils agitent pendant 4 ou 5 heures à l'aide d'une machine 300 grammes de graisse de levure, dont ils n'indiquent pas la composition mais simplement la provenance (firme BÜHRINGER de Mannheim-Waldhorf) avec une solution alcoolique caustique (600 gr. de potasse, 600 cm³ d'eau, 2.400 cm³ d'alcool). Ils diluent ensuite avec un égal volume d'eau et abandonnent quelque temps : il se sépare une grande quantité de flocons jaunes bruns.

REINDEL et ses collaborateurs épuisent alors à l'éther la solution savonneuse par petites portions dans une grande ampoule à décantation, jusqu'à ce que l'éther ne soit plus coloré en jaune clair (environ trois épuisements). Ils lavent deux fois à l'eau la solution éthérée (très alcoolique), la sèchent au sulfate de sodium anhydre, et l'évaporent jusqu'à ce qu'il se montre un léger trouble dû à des gouttelettes d'huile. La cristallisation s'effectue pendant la nuit, et, le jour suivant, la masse cristalline est séparée des eaux-mères et clarifiée par un mélange à P. E. d'alcool et d'éther.

Les auteurs purifient l'ergostérol brut ainsi obtenu par recristallisation dans l'alcool, acétylation et saponification de l'acétate d'ergostéryle par 3 parties de potasse alcoolique.

d) TECHNIQUE DE BILLS, MASSENGALE ET PRICKETT (5). — Ces auteurs insistent surtout sur le mode de dessiccation de la levure ; voici comment ils opèrent :

La levure, recueillie par centrifugation, est lavée à l'eau et centrifugée de nouveau. Le volume du sédiment mesuré est additionné de cinq fois son volume d'alcool méthylique à 75 %. Le mélange est agité vigoureusement et conservé toute la nuit à 13°, puis filtré à la trompe. Le gâteau est placé dans le vide à basse température jusqu'à ce qu'il soit sec mais non complètement. La masse pulvérisée et broyée est passée à travers un tamis de 40 mailles au centimètre et finalement séchée dans un four à vide à 75° pendant 20 minutes. Un gramme de levure sèche est mis à bouillir avec 20 cm³ d'alcool benzène 2/1 pendant quelques minutes ; on décante, filtre et recommence cinq fois de suite. La levure est exprimée, lavée et les filtrats réunis évaporés sont dissous dans l'alcool à 95°. La solution sert à faire une série de spectrogrammes.

BILLS et HONEYWELL (3) donnent deux modes de purification de l'ergostérol : soit par recristallisation dans un mélange solvant particulièrement efficace (alcool-benzène 3/1), soit par saponification d'isobutyrate d'ergostérol purifié.

e) TECHNIQUE INDUSTRIELLE. — Cette technique s'inspire beaucoup de celle de WINDAUS et GROSSKOPF.

Voici à peu près comment l'on opère :

On introduit la levure et l'alcool sodé dans la marmite d'un appareil à reflux, on chauffe 4 heures, on filtre, on lave la levure à l'alcool et on reporte une demi heure dans l'appareil. Les solutions rassemblées sont neutralisées jusqu'à réaction acide faible par *HCl*. On distille d'abord sans vide puis sous vide. On ajoute au liquide restant une solution aqueuse de soude, puis de l'éther, et on agite le tout.

La partie étherée est trouble, on en facilite l'éclaircissement par un peu de soude et on laisse reposer. L'éther décanté est distillé et le résidu lavé à l'alcool fort, chargé d'ergostérol. Par recristallisation dans l'alcool fort on obtient un ergostérol pur.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES.

L'ergostérol n'est pas efflorescent et ne se déshydrate complètement qu'à 105° ; il a alors pour formule $C^{27}H^{42}O$. Replacé anhydre dans l'air libre il reprend rapidement son poids primitif. Il cristallise dans l'alcool en larges lamelles et dans l'éther en fines aiguilles qui appartiennent les unes et les autres au système monoclinique.

L'ergostérol est soluble dans 36 parties d'alcool à 95° bouillant et dans 526 parties à froid, dans 50 parties de chloroforme à 18° et quelques parties à chaud (avec déshydratation partielle), dans 28 parties d'éther anhydre bouillant et 50 parties à 20°, dans 50 parties d'éther hydraté bouillant et 112 parties à 20° [C. TANRET (102)]. Il est soluble à 0,25 % dans l'huile d'olive.

L'ergostérol fond au bloc Maquenne à + 165° [C. TANRET (102)]. BILLS et HONEYWELL (3) trouvent + 174° quand il est hydraté (166° à 183° suivant le degré d'hydratation). Son pouvoir rotatoire en solution chloroformique (ergostérol hydraté) est $(\alpha)_D = -126^\circ$ et -132° pour l'ergostérol anhydre (C. TANRET). En solution étherée on trouve $(\alpha)_D = -105^\circ,5$. BILLS et HONEYWELL (3) donnent comme valeur :

$$(\alpha)_D^{20} = -132^\circ$$

$$(\alpha)_{5961}^{20} = -171^\circ$$

ces auteurs ont noté de très grandes divergences dans la valeur du point de fusion et du pouvoir rotatoire suivant les expérimentateurs et le degré d'hydratation.

L'ergostérol pur de C. TANRET absorbe les radiations de courtes longueurs d'onde d'une manière intense (mille fois plus que le cholestérol ordinaire). Cette absorption est encore appréciable sur le spectrogramme à des dilutions de 1/100.000. La dilution optimale pour la lecture des clichés est de 1/10.000 pour un temps de pose de 30 secondes. On observe alors une absorption maxima localisée entre 2.700 U. A. et 3.000 U. A. qui se résout en trois ou quatre maxima. R. FABRE et H. SIMONNET (20) donnent la valeur des densités optiques pour trois maxima situés à 2.715, 2.820 et 2.940 U. A. MORTON, HEILBRON et KAMM donnent les maxima suivants : 2.700, 2.815, 2.935 U. A. ou 2.690, 2.817, 2.940 d'après HEILBRON, MORTON et SEXTON (42, 43, 44, 45). MAC NAIR a caractérisé une quatrième bande qui présente un maximum à 2.600 U. A. (67). La courbe d'absorption s'affaïsse sous l'influence

de l'irradiation et permet de suivre la transformation de l'ergostérol en ergostérol irradié ou vitamine D.

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.

L'ergostérol abandonné à la température ordinaire s'oxyde lentement, il jaunit et devient odorant. A 0° la transformation est beaucoup plus lente, elle est très rapide vers 100°. Il n'est pas attaqué par une solution alcaline concentrée et bouillante.

Ses solutions chloroformiques brunissent assez rapidement à la lumière.

Tous ces faits mettent en évidence la grande sensibilité de l'ergostérol vis-à-vis de l'oxydation et montrent la difficulté qu'il y a à conserver des échantillons purs.

Indice d'iode. — La détermination de l'indice d'iode permet d'attribuer trois doubles liaisons à la formule de l'ergostérol (I. SMEDLEY MAC LEAN, I. SMEDLEY MAC LEAN et THOMAS) (99).

L'hydrogénation effectuée par WINDAUS et GROSSKOPF confirme cette observation. La détermination de l'indice d'iode de l'ergostérol est difficile (I. SMEDLEY MAC LEAN et THOMAS) (99). DAUBNEY et I. SMEDLEY MAC LEAN (14) donnent des chiffres généralement plus élevés que le chiffre théorique, calculé (anhydre) pour trois doubles liaisons : 199. COPPING (9), employant la méthode de DAM (11, 12), trouve, suivant le temps de contact, des valeurs variant de 264 à 293, mais, même pour un temps très court, le chiffre obtenu n'est pas inférieur à 264. Les valeurs élevées obtenues par COPPING supposent l'existence d'une quatrième double liaison ou bien d'une substitution dans la molécule d'ergostérol.

Faisons remarquer que la détermination de l'indice d'iode des stérols et des résines donne des valeurs très notablement différentes suivant les méthodes employées.

Comme le cholestérol, dont M. BERTHELOT a établi la fonction alcoolique, l'ergostérol est un alcool monoatomique, c'est ce qui ressort de l'analyse de ses esters formique, acétique et butyrique, que C. TANRET a obtenu cristallisés. Au point de vue physique ces esters présentent une propriété intéressante, étudiée par GAUBERT. Ils possèdent une phase liquide anisotrope, mais avec le

propionate et l'acétate cette phase est difficile à mettre en évidence contrairement à ce qui a lieu avec les mêmes esters du cholestérol. Les cristaux liquides des esters de l'ergostérol sont plus visqueux que ceux des dérivés du cholestérol.

BILLS et HONEYWELL (3) ont obtenu d'autres esters cristallisés : l'isobutyrate, l'isovalérate et le cinnamate.

Le benzoate a été également préparé et a servi à REINDEL, WALTER et RAUCH à la purification du stérol (84).

V. TANGE et E. V. Mc COLLUM (106) ont étudié les allophanates de certains stérols suivant la technique indiquée par R. FABRE pour le cholestérol (18).

Réactions colorées. — Nous ferons l'étude de ces réactions après celle de tous les stérols de levure.

ISOMÈRES.

Les isomères de l'ergostérol sont très nombreux et WINDAUS a proposé, en attendant que leur histoire soit suffisamment élucidée, de les désigner chacun par une lettre. L'ergostérol ordinaire est l'ergostérol *A*, auquel font suite les ergostérols *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, et une catégorie spéciale d'isomères, les épimères.

Ergostérol A : C'est l'ergostérol normal que nous avons étudié.

Ergostérol B : Aussi désigné sous le nom d'iso-ergostérol par REINDEL, WALTER et RAUCH, l'ergostérol *B* a été séparé en trois nouveaux isomères par WINDAUS et ses collaborateurs.

REINDEL, WALTER et RAUCH (84) faisaient passer du gaz *ClH* sec dans une solution d'acétate d'ergostérol dans $CHCl^3$ et obtenaient, par évaporation à chaud du solvant, un corps exempt d'halogène qu'ils considéraient comme un isomère de l'acétate d'ergostérol dont ils étaient partis. Par saponification l'ergostérol *B* fut mis en liberté : *P. F.* : 135-136° ; $(\alpha)_D = -86^\circ$.

Reprenant exactement la technique précédente, WINDAUS, DITMAR, MURKE et SUCKFULL (121) ont obtenu un mélange de trois acétates isomères B^1 , B^2 , B^3 qu'ils ont pu séparer. L'acétate de l'isomère B^1 , le moins soluble, se sépare le premier. L'anhydride de l'acide maléique permet de faire entrer l'acétate de B^3 en combinaison. Il reste alors seulement l'acétate de B^2 dans les eaux mères.

Voici les constantes physiques de ces isomères :

B^1 P. F. 148°	$(\alpha)_D = -40.3$
B^2 P. F. 126°	» — 88.4
B^3 » 135-136°	» — 190°

L'ergostérol *B* obtenu par REINDEL donne sensiblement les mêmes réactions colorées (SALKOWSKY et LIEBERMANN-BURCHARD) que l'ergostérol *A*.

Ergostérol C : WINDAUS et RYGH (118) en préparant du cinnamate d'ergostéryle suivant la technique de BILLS et HONEYWELL (3) (chlorure de cinnamyle sur ergostérol) ont obtenu par saponification un ergostérol nouveau qui n'est ni *A* ni *B*. Il fond à 139-140° et présente un pouvoir rotatoire $(\alpha)_D^{47} = -35°$.

Ergostérol D : On peut obtenir ce corps par déshydrogénation du dihydroergostérol au moyen d'acétate de mercure en solution dans un mélange d'alcool éthylique et d'acide acétique, ainsi que Bock l'a montré dans le laboratoire de WINDAUS. Dans un mémoire, WINDAUS (119) donne les principaux caractères de l'ergostérol *D* (ou ergostatriénol *D*) : Aiguilles plates, P. F. : 165°-166°, $(\alpha)_D = +22°$; précipite par le digitonoside. La solution chloroformique donne, avec l'acide sulfurique concentré et l'anhydride acétique, une coloration verte puis marron. Le spectre d'absorption ressemble beaucoup à celui de la cétone correspondante : l'absorption principale se trouve à 400 U. A. plus loin dans la région des courtes longueurs d'onde que celle de l'ergostérol *A*. Il n'acquiert pas de pouvoir antirachitique par irradiation.

Ergostérol E : Obtenu par HEILBRON, JOHNSTON et SPRING (47), il résulte de l'oxydation par l'acétate mercurique du dihydroergostérol. Il se présente en lamelles incolores qui contiennent de l'eau de cristallisation P. F. : 124°-125° $(\alpha)_{5461} = -22.9$.

Il donne une coloration jaune avec le trichlorure d'antimoine et rose pâle avec le réactif de ROSENHEIM.

Ergostérol F : Obtenu par WINDAUS, AUHAGEN, BERGMAN et BUTTE (120) par hydrogénation du déhydroergostérol, au moyen du sodium et de l'alcool.

P. F. : 150°-151°, $(\alpha)_D = -20°$. Peu soluble dans l'éther et le chloroforme, il retient fortement son solvant. Il forme un composé d'addition très peu soluble avec le digitonoside. Son spectre d'absorption indique deux maxima, l'un à 2520 A. U., l'autre à 2350 U. A.

PROPRIÉTÉS DES DIFFÉRENTS ISOMÈRES DE L'ERGOSTÉROL
ET DE LEURS DÉRIVÉS ACÉTYLÉS.

	P. F.	Pouvoir rotatoire	Spectre d'absorption en m μ	Précipité par digitonogénide	Dérivé acétylé	
					P. F.	pouvoir rotatoire
Ergostérol A	160-161°	(α) _D = -117°	270-281 293	+	172-173°	(α) _D = -87°,4
Ergostérol B (mélange de B ¹ , B ² , B ³)	135-136°	(α) _D = -86°,9	247	+	129-131°	(α) _D = -62°,5
Ergostérol B ¹	148°	(α) _D = -46°,3	248	—	142°	(α) _D = -53°,6
Ergostérol B ²	126°	(α) _D = -88°,4	id.		100°	(α) _D = -80°,4
Ergostérol B ³	135°	(α) _D = -190°	id.		132°	(α) _D = -182°
Ergostérol C	139-140°	(α) _D ¹⁷ = -35°	280	+		
Ergostérol D	165-166° 167°	(α) _D ²⁰ = -+22°	240-235 243-252	+	171°	(α) ₅₄₆₁ ²⁰ = +17°,5
		(α) ₅₄₆₁ ⁴³ = +17°,8	235		172°	(α) _D = +15°,9
Epiergostérol D . . .	204°	(α) _D = +30°,3				
U-ergostatriénol . .	154°	(α) _D ¹⁶ = +88°				
Ergostérol E	124-125°	(α) ₅₄₆₁ ⁴⁸ = -22°,9	240	—	151°	(α) _D ⁴⁷ = +103°
Ergostérol F	151°	(α) _D = -20°		+	119-120°	(α) ₅₄₆₁ ⁴⁸ = -38°
Suprastérol I	104°	(α) _D ⁴⁸ = -76°	235-252	+	152-153°	(α) _D ⁴² = -23°,5
			Pas d'abs. spécifique	—		
Suprastérol II . . .	110°		N'absorbant plus après 250.	—		
Hypostérol ?	100-102°	(α) _D = +12°,5				

D'après L.-H. DEJUST et M^{lle} D. VAN STOLK (16).

ERGOSTÉROL ET VITAMINE D.

Dans cette revue des principaux caractères de l'ergostérol, nous ne pouvons passer sous silence les transformations si importantes de ce corps sous l'influence des rayons ultra-violet, et c'est à la suite du paragraphe consacré aux isomères qu'il nous a paru le plus logique de les placer.

L'ergostérol, quand il est irradié par les rayons ultra-violet, acquiert les propriétés de la vitamine D antirachitique, et ce sont les recherches si importantes sur cette vitamine qui ont motivé la somme considérable de publications concernant l'ergostérol. Grâce aux travaux de ROSENHEIM, WEBSTER, BOURDILLON et

leurs collaborateurs en Angleterre, et de WINDAUS et ses élèves en Allemagne, la question de la vitamine *D* est maintenant à peu près résolue.

Sous l'influence de la simple irradiation il se produit à partir de l'ergostérol cinq isomères successivement transformables les uns dans les autres : Lumistérol, tachystérol, vitamine D_2 et enfin deux produits de superirradiation, les suprastérols *I* et *II*. Ces transformations sont irréversibles et aucun des produits obtenus n'est précipitable par le digitonoside. Le schéma suivant dû à WINDAUS résume la filiation de ces corps et montre en outre l'extrême variété des pouvoirs rotatoires de ces isomères.

Ergostérol $\searrow$ Lumistérol $\searrow$ Tachystérol $\searrow$ Vitamine D_2 (Calciférol) $\searrow$ Suprastérols <i>I</i> et <i>II</i>				
$(\alpha)_D = -127^\circ$	$(\alpha)_D = +191^\circ$	$(\alpha)_D = -86^\circ,3$	$(\alpha)_D = +102^\circ,5$	I $(\alpha)_D = -96^\circ$ II $(\alpha)_D = +62^\circ,9$
non antirachitique non toxique	non antirachitique non toxique	non antirachitique toxique	antirachitique toxique	non antirachitiques toxiques

Nous empruntons à une revue de G. TANRET (105) les propriétés suivantes de la vitamine *D* :

« La vitamine *D* pure — calciférol ou vitamine D_2 — est plus soluble dans les solvants que la vitamine D_1 . Ses aiguilles fondent à $115-117^\circ$. Son pouvoir rotatoire est de $(\alpha)_{5161} = +122^\circ$, de $(\alpha)_D = +102^\circ 5$ dans l'alcool et seulement de $+33^\circ$ dans la benzine. Elle présente dans l'ultra-violet un maximum d'absorption à $265 \text{ m}\mu$. Isomère de l'ergostérol, elle a pour formule $C^{27}H^{42}O$. La réaction de LIEBERMANN donne une coloration rouge puis verte ; la réaction de TORTELLI-JAFFÉ, une coloration bleue : ces colorations sont quatre fois plus faibles que pour l'ergostérol. A froid elle ne se combine que très lentement avec l'anhydride citraconique : 6 % seulement en douze jours à 17° . L'oxygène ne l'attaque qu'à peine à la température ordinaire. »

L'utilisation de la vitamine *D* et par suite de l'ergostérol en thérapeutique sortirait du cadre de ce travail. Nous signalons seulement leur utilisation possible dans toutes les maladies qui relèvent d'un trouble du métabolisme du calcium et nous indiquons au lecteur l'étude très documentée de V. JOURDAIN et H. SIMONNET (96).

Zymostérol.

Le zymostérol est le second stérol isolé de la levure de bière, il a été décrit à des dates très rapprochées par I. SMEDLEY MAC LEAN (100) et surtout par H. PÉNAU et G. TANRET (81) qui ont donné plus de précisions concernant sa composition.

Préparation : Par saponification des extraits alcooliques de levure, on isole par les méthodes ordinaires un résidu insaponifiable, dont on sépare par de nombreuses recristallisations dans l'alcool, l'éther et l'acétone, l'ergostérol moins soluble et le zymostérol que l'on fait recristalliser de nombreuses fois dans l'éther anhydre.

Quant à la teneur du zymostérol dans la levure, I. SMEDLEY MAC LEAN indique 2 parties d'ergostérol pour une partie de zymostérol. H. PÉNAU et G. TANRET donnent 1 gr. à 1 gr. 5 d'ergostérol et 1 gr. de zymostérol par kilogramme de levure fraîche (levure pressée à 28 % de matière sèche).

Propriétés physiques : Le zymostérol apparaît être plus instable encore que l'ergostérol sous l'action de l'eau et de la lumière. Pour ses diverses solubilités nous citerons H. PÉNAU et G. TANRET (81) : « Beaucoup plus soluble dans les solvants que l'ergostérol, ce stérol se dissout à 18° dans 18 parties d'alcool absolu, 26 d'alcool à 95°, 48 d'alcool méthylique, 11 d'éther anhydre, 15 d'acétone anhydre, 38 de benzène. Alors que 1 gr. d'ergostérol n'est soluble à froid que dans 325 à 350 cm³ d'huile (huile d'olive, d'amandes douces, de coton, de sésame...) le zymostérol se dissout dans 80 volumes des mêmes huiles. »

Le zymostérol fond en tube effilé entre 106° et 110° suivant les auteurs. Son pouvoir rotatoire a été trouvé de $(\alpha)_D = + 34^{\circ}1$ dans l'éther (I. SMEDLEY MAC LEAN) et $(\alpha)_D = + 34^{\circ}$ en solution chloroformo-alcoolique (H. PÉNAU et G. TANRET). F. REINDEL et A.

WEICKMANN (87) en faisant recristalliser un zymostérol très pur ne présentant plus la réaction de HAÜSSLER et BRAUCHLI pour l'ergostérol, donnent comme pouvoir rotatoire $(\alpha)_D = +49^\circ$ et un point de fusion situé entre 106° et 110° . G. TANRET avait d'ailleurs déjà indiqué que le pouvoir rotatoire du zymostérol est certainement plus élevé que $+34^\circ$ et il a lui-même préparé récemment de grandes quantités de stérol $+42^\circ$.

Le spectre d'absorption a été étudié par R. FABRE et H. SIMONNET (25). Ils trouvent que le zymostérol est beaucoup moins absorbant que l'ergostérol et en particulier qu'il ne présente pas de bandes d'absorption dans la zone 2700-3000 U. A. En outre la courbe n'est pas modifiée par irradiation dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'ergostérol.

Propriétés chimiques et formules.

H. PÉNAU et G. TANRET donnent pour formule brute	$C^{27}H^{42}O^2, H^2O$
I. SMEDLEY MAC LEAN indique	— $C^{27}H^{42}O$
F. REINDEL et A. WEICKMANN donnent	— $C^{27}H^{44}O$

Le zymostérol brunit à 100° et se déshydrate. Il donne un complexe avec le digitonoside (voir dosages).

La détermination de l'indice d'iode selon la méthode de HÜBL (57) a donné 226 (I. SMEDLEY MAC LEAN) (100) ou 200 (H. PÉNAU et G. TANRET) (81) ce qui donnerait à penser que le zymostérol possède trois doubles liaisons. Toutefois F. REINDEL et A. WEICKMANN n'en admettent que deux (87).

Les réactions colorées du zymostérol seront étudiées dans le chapitre suivant.

Autres stérols de la levure.

C. BILLS et E. HONEYWELL ont découvert le cérévistérol et lui assignent les propriétés suivantes : $(\alpha)_D = -49^\circ$. $P. F. = +240^\circ$.

Les autres stérols de la levure ont été, jusqu'à maintenant, étudiés uniquement par WIELAND et ses élèves.

Par benzylation et cristallisation fractionnée dans l'éther acétique et dans l'acétone, H. WIELAND et M. ASANO ont obtenu (113) :

I. 2 benzoates peu solubles : benzoate d'ergostérol et benzoate d'un isomère, dénommé benzoate de néostérol, qui ne diffère du premier que par son pouvoir rotatoire.

II. Des benzoates plus solubles, difficilement séparables en 3 composés définis : benzoate de zymostérol, d'ascostérol et de faecostérol.

L'ergostérol et le néostérol présentent les mêmes réactions colorées, les 3 autres stérols, par contre, possèdent des réactions différentes.

En benzoylant, en présence de pyridine, les produits résineux résiduels de la préparation de l'ergostérol, H. WIELAND et G. GOUCH (114) ont retiré trois nouveaux stérols : l'épistérol (isomère du zymostérol, possédant 2 doubles liaisons et donnant des colorations voisines), l'anastérol et l'hypostérol.

Enfin, dernièrement, H. WIELAND et V. M. STANLEY (115) ont séparé des eaux-mères, par cristallisation dans l'alcool méthylique, le kryptostérol. $P. F. 135^{\circ}\text{--}136^{\circ} (\alpha)_D^{20} = + 63^{\circ},6$.

Le tableau suivant résume les principales propriétés de ces stérols et de leurs benzoates.

Stérols	Nombre de doubles liaisons vraisemblables	Point de fusion	$(\alpha)_D$	Benzoates	
				Point de fusion	$(\alpha)_D$
Ascostérol	1	141-142°	+ 45°	130-131°	+ 37°
Faecostérol ...	1	161-163°	+ 42°1	144-146°	+ 34°7
Zymostérol	2	108-110°	+ 47°3	126-128°	+ 36°4
Epistérol	2	135-136°	+ 6°2	161-163°	+ 11°8
Anastérol	2	157-159°	— 8°1	180-182°	— 13°8
Stérol 145°	2	144-146°	— 33°8	158-160°	— 4°4
Néostérol	2	164-165°	— 105°	173-175°	— 50°6
Ergostérol	3	160-161°	— 133°1	168-170°	— 71°5
Hypostérol	3	100-102°	+ 12°5	119-121°	+ 19°1

(D'après H. WIELAND et G. GOUCH (114).

B. — RÉACTIONS COLORÉES DES STÉROLS DE LEVURE

Nous allons passer en revue les très nombreuses réactions colorées données pour caractériser les différents stérols. Nous étudierons successivement :

- 1^o La réaction de LIEBERMANN-BURCHARD.
- 2^o La réaction de SALKOWSKI à l'acide sulfurique.
- 3^o La réaction de WITHBY et GOLODETZ à l'acide sulfurique formolé.
- 4^o La réaction d'HIRSCHSHON-ROSENHEIM à l'acide trichloracétique.
- 5^o La réaction de ROSENHEIM au chloral.
- 6^o La réaction de STEINLE et KAHLENBERG au pentachlorure d'antimoine.
- 7^o La réaction de TORTELLI-JAFFÉ.
- 8^o La réaction de NEUBERG.
- 9^o La réaction de TSCHUGAEW.

Nous ferons entrer dans ce cadre d'autres réactions données par d'autres auteurs, mais que nous pensons pouvoir rattacher à l'une ou l'autre des neuf réactions-types précédentes.

Nous donnerons, chaque fois que les auteurs l'auront fait, les groupements moléculaires auxquels les réactions considérées doivent se rapporter, et autant que possible la limite de sensibilité des réactions.

Pour chacune de ces réactions nous diviserons le texte en plusieurs paragraphes et nous désignerons par la lettre *A* la technique par la lettre *B* les relations moléculaires, par la lettre *C* les stérols donnant la réaction, et par la lettre *D* la limite de sensibilité.

Réaction de Liebermann-Bürchard. (64) (6)

Cette réaction nous servira dans tout le courant de cet ouvrage, aussi nous l'étudierons d'une façon complète dans le paragraphe suivant avec les modes de dosage. Nous n'indiquerons ici que ce qu'en a écrit LIEBERMANN lui-même :

L'auteur dissout la substance à étudier dans l'anhydride acétique froid, il ajoute goutte à goutte de l'acide sulfurique concentré pur, refroidi. Il remarque l'apparition d'une teinte rouge fugace qui fait place à une teinte bleue après nouvelle addition d'une petite quantité d'acide sulfurique.

De nuances analogues que donnent les acides chinovique, pyrochinovique, pimarique et silvinique, LIEBERMANN conclut qu'il n'est pas invraisemblable qu'il y ait quelques analogies de connexion entre eux et le cholestérol.

Réaction de Salkowski à l'acide sulfurique. (94)

A. — La réaction de SALKOWSKI est basée sur la coloration que prennent l'acide sulfurique et le chloroforme mis en présence d'un stérol. Ou bien on dissout le stérol dans l'acide sulfurique concentré et on agite cette solution avec du chloroforme, ou bien, plus généralement, le stérol est en solution chloroformique et on lui ajoute partie égale d'acide sulfurique concentré (66° B) : c'est la technique innovée par SALKOWSKI. La température habituelle de réaction est celle du laboratoire (20°).

B. — V. I. NICOLAIEF et S. A. KRASILEOSKAIA (78) ont été conduits à penser que pour le cholestérol cette réaction était due à la formation d'un ester sulfurique.

C. — Le cholestérol colore en jaune l'acide sulfurique concentré et après agitation le chloroforme se colore lui-même en jaune.

L'ergostérol, au contraire, colore en rouge l'acide sulfurique concentré et le chloroforme agité avec cette solution reste incolore.

Il en est de même du zymostérol (H. PÉNAU et G. TANRET) (81) ; E. VICTOR, LÉVINE et EUDICE RICHMANN (63) signalent la même inversion de la réaction en employant de l'acide sulfurique contenant du sélénium de sodium.

WIELAND et ses élèves donnent pour coloration de l'acide sulfurique : rouge rubis pour l'ergostérol, le néostérol et l'hypostérol, et jaune orangé pour les autres stérols (113, 114, 115).

Les extraits de levure donnent une coloration de l'acide sulfurique, très voisine de celle de l'ergostérol.

D. — Nous avons trouvé comme limite de sensibilité de la réaction 1/500.000 pour le zymostérol et 1/1.000.000 pour l'ergostérol,

soit 0 mgr. 001 par cm^3 . La réaction de SALKOWSKI est certainement la plus sensible mais aussi la moins spécifique.

Réaction de Whitby et Golodetz à l'acide sulfurique formolé.

A. — Après GOLODETZ pour le cholestérol (35), WHITBY (111) avait indiqué dès 1923 des réactions des stérols basées sur l'emploi de l'acide sulfurique formolé (SO^4H^2 5 volumes, formol 1 volume).

A 2 cm^3 de chloroforme contenant 1 à 2 milligrammes de stérol, on ajoute 2 cm^3 de réactif. On obtient ainsi deux couches, une supérieure rouge cerise et l'autre inférieure rouge brun avec fluorescence verte ; la couche supérieure introduite dans un tube sec avec quelques gouttes d'anhydride acétique donne une coloration verte.

WHITBY donne encore deux variantes moins intéressantes de sa réaction.

B. — Les auteurs n'indiquent pas les groupements moléculaires auxquels la réaction pourrait se rapporter.

C. — Nous avons essayé la réaction avec le mélange tel que l'indique GOLODETZ :

Aldéhyde formique à 30 %		3 parties en poids
Acide sulfurique à 98 %		5 parties —

Nous avons d'abord mis en présence un milligramme de corps avec 8 gouttes du réactif. Après un contact d'une demi-heure, les cristaux de cholestérol étaient bruns, ceux d'ergostérol rose-rouge et ceux du stérol ($\alpha_D = + 40^\circ$) brun très foncé.

Nous avons ensuite essayé la réaction en mettant en présence 2 cm^3 de solution chloroformique au millième et 2 cm^3 du réactif.

Le cholestérol après 20 minutes n'a donné aucune réaction.

L'ergostérol a donné une solution sulfurique rouge orangé et chloroformique violette.

Le zymostérol une solution sulfurique jaune ocre et chloroformique violacée.

Un extrait de levure nous a donné une solution sulfurique rose rouge et chloroformique jaunâtre.

La séparation des réactifs en deux couches et les teintes variables empêchent la mise en pratique d'un dosage basé sur cette réaction.

D. — Pour l'ergostérol nous avons trouvé une sensibilité moyenne de 1/100.000 environ, soit 0 mgr. 04 pour 4 cm³ de liquide entrant dans la réaction.

Réaction de Hirschsohn-Rosenheim à l'acide trichloracétique.

A. — HIRSCHSOHN (54) avait indiqué dès 1902, pour le cholestérol, une réaction basée sur l'emploi d'acide trichloracétique concentré 9/10, réaction très lente à apparaître, sauf à l'ébullition. En modifiant légèrement les conditions de la réaction, ROSENHEIM (90) l'a appliquée avec succès à la diagnose de l'ergostérol.

En présence d'ergostérol dissous dans quelques gouttes de chloroforme, une solution aqueuse d'acide trichloracétique concentré (acide 9 gr., eau 1 gr.) développe une coloration rouge caractérisée par une bande d'absorption à 5.000 U. A. ; cette coloration vire directement au bleu et on trouve alors deux bandes d'absorption situées entre 5.700 U. A. et 5.800 U. A., et entre 6.500 U. A. et 6.800 U. A.

B. — ROSENHEIM et à sa suite HEILBRON et SPRING (49) pensent que, selon toutes probabilités, la réaction dépend de la présence d'une liaison éthylenique Δ [1 : 13] ou Δ [1 : 2] dans le système cyclique du stérol (voir formule développée p. 14).

HIRSCHSOHN, pour le cholestérol, avait été conduit à admettre que la réaction est accélérée par la présence d'un peu d'acide chlorhydrique libre.

C. — D'après HEILBRON et SPRING (49) cette réaction est donnée par l'ergostérol, l' α et le β isoergostérol, le dihydro et le déhydro-isoergostérol ; elle n'est pas donnée par les α et β dihydroergostérol ni par les α et β ergosténol.

Pour le zymostérol, H. PÉNAU et G. TANRET (81) ont vu la réaction décroître au cours des purifications, mais ne l'ont pas vue s'annuler.

WIELAND et ses élèves donnent la réaction comme négative pour le fæcostérol, l'ascostérol et le zymostérol ; celle du néostérol est identique à celle de l'ergostérol (114).

Nous avons expérimenté cette réaction en employant le réactif suivant :

Acide trichloracétique	9 grammes
Eau distillée	1 gramme

Nous avons ajouté II gouttes de ce réactif à III gouttes d'une solution au millième de cholestérol, d'ergostérol $(\alpha)_D = -112^{\circ},5$ et de stérol droit $(\alpha)_D = +40^{\circ}$. La coloration obtenue fut pour le cholestérol nulle, pour l'ergostérol une teinte bleue qui une demi-heure après a fait place à une forte coloration violette, et pour le stérol droit une faible coloration bleue qui a viré au gris après une demi-heure.

Dans les mêmes conditions, un extrait chloroformique de levure nous a donné une coloration rose intense, fugace, variable avec la quantité d'acide trichloracétique et faisant rapidement place à une coloration bleue.

Suivant les proportions des corps en présence, ces colorations subissent de grandes variations; c'est ainsi que l'ergostérol peut très bien donner du rose après une minute et du vert-gris après une demi-heure. Aussi nous ne croyons pas que cette réaction puisse servir pour un dosage colorimétrique.

D. — ROSENHEIM donne comme limite de sensibilité pour l'ergostérol : 0 mgr. 005 pour une réaction effectuée sur quelques gouttes.

Réaction de Rosenheim au chloral.

A. — ROSENHEIM (91) indique ainsi sa réaction :

Si l'on met 1 milligramme ou même moins d'ergostérol ou d'un de ses esters avec 0 gr. 50 environ d'hydrate de chloral liquéfié ($P. F. = 58^{\circ}$) on obtient une solution rouge carmin qui montre une large bande d'absorption à 5.000 U. A. La coloration vire ensuite au vert puis au bleu foncé, cette dernière teinte étant très stable. Le chloral anhydre ne fournit pas la réaction qui apparaît après addition d'une trace d'eau. Avec les autres stérols naturels et leurs dérivés, la coloration ne se produit pas à la condition que ces produits soient parfaitement exempts d'ergostérol.

B. — L'auteur conclut que la production immédiate avec ces deux réactifs d'une coloration rouge traduit l'existence dans la molécule d'une double liaison en 1-2 (ou 1-13). Il suggère l'hypothèse que le premier stade de toutes les réactions colorées des stérols met en jeu cette double liaison.

Réaction de Steinle et Kahlenberg au pentachlorure d'antimoine.

A. — KAHLBERG (59) puis STEINLE et KAHLBERG (101) disent que : « si l'on ajoute une solution diluée de cholestérol à une solution chloroformique de pentachlorure d'antimoine on obtient un précipité boueux, brun, qui, dilué dans le chloroforme donne une solution pourpre clair, laquelle change rapidement en une couleur bleu cobalt par exposition à la lumière. La coloration bleue est très stable à basse température et dans l'obscurité. Après une longue exposition à la lumière elle change légèrement et verdit ».

Nous employons :

Solution chloroformique de stérol au 1/600..	V gouttes
Pentachlorure d'antimoine	I goutte

Puis après cinq minutes nous ajoutons :

Chloroforme pur	5 cm ³
-----------------------	-------------------

B. — D'après l'analyse et le poids moléculaire du composé J. V. STEINLE et L. KAHLBERG pensent qu'il s'agit là d'une simple réaction d'addition.

C. — Les auteurs de la réaction disent avoir déjà obtenu une coloration bleue se développant plus lentement, avec le phytostérol.

Avec la technique indiquée plus haut nous avons seulement observé des colorations variant du rose au rouge brun.

Si le zymostérol, comme l'ergostérol, donne un précipité rouge brun avec le pentachlorure, l'addition de chloroforme ne fournit qu'une solution de coloration rose avec l'ergostérol et rose très clair avec le zymostérol.

Un extrait chloroformique de levure fournit des colorations identiques : précipité brun et solution rose ou brune.

Pour H. PENAU et G. TANRET (81) le zymostérol semble encore donner une coloration rose faible et de courte durée.

Quoi qu'en disent J. V. STEINLE et L. KAHLBERG, nous ne pensons pas qu'une telle réaction puisse servir de base pratique à un dosage.

Les colorations données sont trop variées, il faut se tenir dans des limites trop précises qui obligent à un premier tâtonnement ;

de plus elles se détruisent rapidement à la lumière, en moins d'une demi-heure.

Enfin la réaction est loin d'être spécifique puisqu'elle est donnée par l'acide acétique, le colophane, les terpènes...

D. — Avec 0 mgr. 1 nous avons obtenu une coloration encore assez nette pour l'ergostérol et à peine sensible pour le zymostérol. soit une sensibilité de 1/5000 pour l'ergostérol.

Réaction de Tortelli-Jaffé.

A. — Les deux auteurs présentent leur réaction comme spécifique des huiles de poisson et de leurs produits d'hydratation (108).

Ils mélangent 1 cm³ d'huile, 6 cm³ de chloroforme et 1 cm³ d'acide acétique glacial, puis ils ajoutent XL gouttes d'une solution à 10 % de brome dans le chloroforme. Après une minute, ils observent une coloration verte qui pendant une heure s'intensifie peu à peu.

Annoncée comme spécifique de l'ergostérol, elle ne se développe que très lentement avec 0 mgr. 5 d'ergostérol. HEILBRON et SPRING rendent la réaction instantanée et plus sensible en employant la technique suivante (49) :

On dissout un cristal d'ergostérol dans l'acide acétique glacial (5 cm³) et on ajoute sans mélange, au moyen d'une pipette, un 1 cm³ d'une solution à 2 % de brome dans du chloroforme ; un anneau vert apparaît à la surface de contact des deux solutions.

B. — La réaction du brome dépendrait de la double liaison éthylénique Δ [10 : 19] ou Δ [10 : 11] absente dans le cholestérol (49).

C. — Un tableau de HEILBRON et SPRING (49) montre qu'aucun des dérivés du cholestérol ne donne cette réaction alors que de nombreux dérivés de l'ergostérol la donnent.

E. HAÜSSLER et P. BRAUCHLI (39) ont donné la réaction comme spécifique de l'ergostérol et de ses sels ; REINDEL et WEIKMANN (87) étudient un zymostérol ne donnant plus cette réaction.

Par contre WIELAND et ses élèves donnent pour presque tous les stérols des colorations jaunes évoluant vers les verts ; seuls l'anastérol et l'hypostérol fournissent seulement une teinte jaune (114).

D. — Jusqu'à 0 mgr. 20 d'ergostérol nous avons obtenu une légère coloration, soit une sensibilité de 1/25.000.

Réaction de Neuberg.

Une solution alcoolique de cholestérol additionnée d'une trace de rhamnose et déposée sur l'acide sulfurique concentré donne un anneau rouge groseille. Si l'on refroidit le tube et que l'on mélange les deux liquides, on obtient une coloration rouge (NEUBERG) (76).

MONTIGNIE a essayé divers sucres, il a noté qu'il ne se formait pas d'anneau et que les couleurs obtenues se manifestaient après agitation. Le maltose lui a donné, avec l'ergostérol, une coloration rose pâle que ne lui donnait ni le cholestérol, ni le phytostérol du son (73).

Réaction de Tschugaew.

D'après une communication de TSCHUGAEW (109), le cholestérol en solution dans l'acide acétique glacial, additionné de chlorure d'acétyle et chlorure de zinc anhydre, donne, si on chauffe le mélange, une couleur rouge éosine : A. L. BERNOULLI (2) a appliqué cette réaction au dosage du cholestérol et de l'ergostérol. Il emploie en général les doses suivantes :

Solution acétique de stérol (0,05 mgr. par cm ³)...	10 cm ³
Chlorure d'acétyle	5 cm ³
Chlorure de zinc solide, sec	0 gr. 5

On porte au B. M. 20' minutes.

La coloration brun jaune peut se conserver 4 mois.

MEESEMACKEK (70) a indiqué une réaction voisine pour caractériser l'ergostérol irradié. Il a, en effet, remarqué que l'addition de chlorure de zinc à une solution chloroformique d'ergostérol produit une coloration rose fugace faible avec les produits n'ayant subi aucune irradiation et une coloration verte avec les produits irradiés.

C. — LE DOSAGE DES STÉROLS

Nous étudierons successivement les méthodes physiques et les méthodes chimiques que nous avons relevées comme employées ou étudiées en vue du dosage des stérols.

Deux possibilités de dosages physiques s'offrent à nous : le dosage polarimétrique et celui par mesure de l'absorption dans l'ultra-violet. Quant aux dosages chimiques, ils sont au nombre de trois : pondéral, volumétrique et colorimétrique.

Nous insisterons surtout sur la méthode colorimétrique basée sur l'emploi de la réaction de LIEBERMANN, laquelle nous servira pour nos recherches ultérieures. Notre but n'est pas en effet d'extraire les stérols et de les doser ensuite, mais bien de les estimer dans un liquide extractif obtenu à partir de la levure de bière. Dans l'état actuel de nos connaissances, il était impossible de doser avec certitude chaque stérol en particulier et c'est pourquoi nous avons cherché à les doser en bloc par la méthode colorimétrique.

Dosages employant les méthodes physiques.

DOSAGE POLARIMÉTRIQUE.

Il nous a paru intéressant de reproduire ici l'essentiel d'un travail de E. KAHANE et J. RABATÉ étudiant la possibilité d'une analyse polarimétrique des systèmes ternaires avec application à un mélange de trois stérols (58). Si une telle analyse est possible, il ne serait peut-être pas trop difficile de l'appliquer à des mélanges plus complexes de stérols.

E. KAHANE et J. RABATÉ utilisent pour cette analyse le cas général où la dispersion peut être représentée par une formule de DRUDE à un seul terme :

$$(\alpha) = \frac{A}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$$

(α) est le pouvoir rotatoire spécifique pour la longueur d'onde λ , A et λ_0 sont des constantes caractéristiques (la valeur de λ_0 étant liée à la position des bandes d'absorption dans l'ultra-violet).

Si l'on désigne par x, y, z , les poids des trois substances optiquement actives qui se trouvent dans l'unité de volume du milieu étudié, si les dispersions rotatoires des trois substances sont représentées par les formules :

$$(\alpha)_1 = \frac{A_1}{\lambda^2 - \lambda_1^2} \quad (\alpha)_2 = \frac{A_2}{\lambda^2 - \lambda_2^2} \quad (\alpha)_3 = \frac{A_3}{\lambda^2 - \lambda_3^2}$$

et que les rotations observées pour les longueurs d'onde $\lambda, \lambda', \lambda''$, sont respectivement $\alpha, \alpha', \alpha''$, on peut établir le système d'équation du premier degré à trois inconnues :

$$\begin{aligned} \frac{A_1}{\lambda^2 - \lambda_1^2} x + \frac{A_2}{\lambda^2 - \lambda_2^2} y + \frac{A_3}{\lambda^2 - \lambda_3^2} z &= \alpha \\ \frac{A_1}{\lambda'^2 - \lambda_1^2} x + \frac{A_2}{\lambda'^2 - \lambda_2^2} y + \frac{A_3}{\lambda'^2 - \lambda_3^2} z &= \alpha' \\ \frac{A_1}{\lambda''^2 - \lambda_1^2} x + \frac{A_2}{\lambda''^2 - \lambda_2^2} y + \frac{A_3}{\lambda''^2 - \lambda_3^2} z &= \alpha'' \end{aligned}$$

Pour que ce système soit déterminé, il faut et il suffit que $\lambda \neq \lambda' \neq \lambda''$ ce qui est vrai par hypothèse et $\lambda_1 \neq \lambda_2 \neq \lambda_3$ ce qui est le cas général.

Après étude expérimentale d'un mélange de cholestérol, ergostérol et zymostérol les auteurs donnent à leur travail les conclusions suivantes :

« En définitive, nous avons montré que si le système d'équation obtenu au cours de l'analyse purement polarimétrique d'un mélange ternaire n'est pas rigoureusement indéterminé, il est assez proche de l'indétermination pour que les erreurs expérimentales et celles dues à l'approximation des calculs, prennent une importance énorme : pratiquement un pareil système peut être considéré comme indéterminé.

« En revanche si l'on utilise seulement deux équations basées sur la détermination polarimétrique, en leur adjoignant une troisième équation basée sur une détermination gravimétrique, le calcul donne des résultats pratiquement utilisables. »

Il apparaît donc que l'emploi du polarimètre seul, est à rejeter pour le dosage des stérols de levure : il pourrait simplement donner des équations d'appoint.

DOSAGES PAR MESURE DE L'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET.

Nous nous contenterons ici de résumer les principes et de discuter les techniques employées. Nous renvoyons pour les généralités photométriques à l'ouvrage de Ch. FABRY (28) et pour la pratique à l'opuscule du constructeur londonien A. HILGER (52).

Principes. — Si l'on représente par I_0 l'intensité du flux incident et par I l'intensité du flux transmis, il y aura, en lumière monochromatique, proportionnalité entre ces deux intensités, et l'on pourra écrire :

$$\frac{I_0}{I} = k$$

k est une constante pour une longueur d'onde donnée.

Si la lumière traverse successivement plusieurs milieux, on aura (en considérant comme nuls les facteurs de réflexion des surfaces limitant ces milieux) :

$$K = k_1 \times k_2 \times k_3 \dots$$

On appelle densité optique :

$$D = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

d'où :
$$D = d_1 + d_2 + d_3 \dots$$

ou encore en généralisant :

$$D = \log_{10} \frac{I_0}{I} = d \cdot \alpha_0 \cdot c$$

d = épaisseur du milieu traversé ;

c = concentration ;

α_0 = coefficient d'extinction (ou pouvoir d'absorption) de la solution pour l'unité d'épaisseur et de concentration.

Cette dernière formule permet en calculant le rapport des intensités lumineuses, de connaître, par comparaison, la quantité d'un corps x contenu dans une solution donnée.

La mesure de l'absorption dans l'ultra-violet peut se faire suivant deux méthodes : la spectrographie et la spectrophotométrie ; nous allons les examiner successivement.

Spectrographie. — C'est la technique qui a été la plus employée. Elle consiste à produire sur une plaque photographique l'image d'un spectre de rayons ultra-violetes produits par une source et dispersés par un système optique en quartz. Si l'on intercale une substance absorbante sur le trajet du faisceau incident, on aperçoit des variations du noircissement photographique qui correspondent à l'absorption. On peut faire varier celle-ci en modifiant, comme nous l'avons vu plus haut, soit l'épaisseur de la substance considérée, soit sa concentration, ou bien encore en faisant varier le temps de pose à l'aide d'un secteur tournant par exemple.

Si l'on veut, pour un dosage, mesurer l'intensité de l'absorption, la manière la plus simple consiste à examiner le spectrogramme à l'aide d'un microphotomètre enregistreur, opération qui consiste à faire défiler le cliché devant une cellule photoélectrique éclairée par une lampe.

Les variations du noircissement photographique détermineront des différences d'intensité dans le courant photoélectrique qui après amplification seront finalement traduites sur le papier par un galvanomètre enregistreur.

Cette méthode comporte de nombreuses opérations, ce qui augmente les causes d'erreur. Elle est délicate. Sa sensibilité est subordonnée à celle de la cellule photoélectrique et surtout à celle de la plaque photographique qui doit posséder des grains très petits, uniformes, et d'une sensibilité égale pour différentes longueurs d'ondes : toutes conditions pratiquement impossibles de trouver réunies.

Ce mode de dosage par l'emploi de spectrogrammes a été utilisé par BILLS, MASSENGALE et PRICKETT pour le calcul de la teneur en ergostérol de différentes levures (5) ; ils cherchaient la limite d'extinction pour 2820 U. A. et indiquaient déjà que certains solvants comme l'alcool méthylique agissaient en dissolvant certains pigments gênants qui ont une bande d'absorption dans l'ultra-violet.

Tout en conservant les critiques formulées plus haut, nous ne devons pas oublier que nous ne connaissons pas encore d'une façon précise les spectres d'absorption des différents stérols de levure. Nous savons seulement par les travaux de R. FABRE et SIMONNET sur le zymostérol (25) que celui-ci ne possède pas de bandes d'absorption au-dessus de 2820 U. A.

Spectrophotométrie. — La spectrophotométrie est une mesure directe de l'absorption dans l'ultra-violet. Elle consiste à projeter le faisceau ultra-violet dispersé par un monochromateur sur une cellule photoélectrique à paroi de quartz. On supprime ainsi la plaque photographique, mais le métal photoélectrique employé (cadmium, potassium) possède une très grande sélectivité de l'effet photoélectrique suivant la longueur d'onde, ce qui restreint beaucoup l'emploi de la spectrophotométrie.

Récemment CHEVALIER et DUBOULOZ (7) ont mis au point une méthode spectrophotométrique qui permet les mesures d'absorption dans toute l'étendue de l'ultra-violet depuis 4000 U. A. jusqu'à 1850 U. A. Le principe de cette méthode consiste à supprimer l'effet de sélectivité en intercalant entre la cellule photoélectrique et le faisceau ultra-violet, une substance fluorescente comme le salicylate de soude, qui jouera le rôle d'un véritable relai et transformera en lumière fluorescente violette toute radiation de longueur d'onde inférieure. Le procédé est correct car on sait qu'il y a proportionnalité entre l'intensité de la lumière excitatrice et la lumière de fluorescence ; de plus celle-ci a toujours la même composition.

Cette dernière méthode présentera un très grand intérêt le jour où l'on connaîtra les spectres d'absorption de tous les stérols de levure et de leurs esters.

Dosages employant les méthodes chimiques.

DOSAGE PONDÉRAL.

La méthode consiste à utiliser la technique classique de WINDAUS (116) pour le dosage du cholestérol : formation en milieu alcoolique d'un complexe cholestérol-digitonoside, isolement, purification et pesée de ce complexe.

Ce dosage a été mis au point pour le cas des divers stérols, en particulier par H. PÉNAU et M^{lle} Z. HARDY pour l'ergostérol et H. PÉNAU et G. TANRET pour le zymostérol. Ces auteurs nous donnent les chiffres suivants :

100 gr. du complexe ergostérol-digitonoside correspondent à 25 gr. d'ergostérol. H. PÉNAU et M^{lle} Z. HARDY (82).

100 gr. du complexe zymostérol-digitonoside correspondent à 26 gr. 9 de zymostérol. H. PÉNAU et G. TANRET (84).

La levure renfermant ces deux stérols dans les proportions relatives moyennes de 1 gr. et 1 gr. 5 (H. PÉNAU et G. TANRET), on pourrait prendre un chiffre compris entre 25 gr. et 26 gr. 9. Mais outre que nous ne connaissons rien sur les autres stérols, il peut arriver que par exposition au soleil, soit de la levure, soit de la solution extractive, on transforme une partie de l'ergostérol en stérol irradié non précipitable par le digitonoside (110). D'autre part cette méthode pondérale ne saurait être une méthode rapide ; des expériences personnelles nous ont en effet prouvé qu'il fallait purifier très fortement la solution extractive des quelques matières étrangères qu'elle contenait (gomme de levure, lécithine, etc.) pour avoir un dosage correct au digitonoside. Il faut aussi tenir compte de la très grande altérabilité du zymostérol vis-à-vis de la réaction de précipitation au digitonoside.

En résumé si le dosage pondéral au digitonoside est de tous le plus précis pour l'estimation d'un stérol donné dans une solution donnée, il s'avère imparfait pour des solutions complexes renfermant de nombreux stérols, comme celles obtenues à partir de la levure de bière. Si l'on veut doser séparément les stérols, il est inférieur à la méthode spectrophotométrique ; si l'on veut simplement avoir une idée du bloc des stérols et de leurs esters, il ne dose qu'une partie de ceux-ci et exige des manipulations beaucoup plus longues que le dosage colorimétrique (le digitonoside ne précipite pas les esters des stérols).

DOSAGE VOLUMÉTRIQUE.

A. OKEY (79) donne pour le cholestérol un dosage qui pourrait très facilement être appliqué aux autres stérols. Ce dosage est basé sur l'oxydation du digitonoside ayant précipité le cholestérol, par le bichromate d'argent en milieu sulfurique ; l'excès de bichromate est ensuite dosé par iodométrie.

Nous ne citons ce dosage que pour mémoire, car il est évident que les remarques formulées plus haut s'y appliquent intégralement, et il possède de plus tous les inconvénients d'un dosage volumétrique.

DOSAGE COLORIMÉTRIQUE.

Les travaux de GRIGAUT (36, 37) pour le dosage du cholestérol sanguin ont mis en vedette l'emploi de la réaction de LIEBERMANN

pour le dosage du cholestérol. La réaction a été employée par HEIDUSCHKA pour le dosage des stérols de levure (40).

On sait que la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD consiste à mettre en présence une solution chloroformique à étudier, de l'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique. Il se développe une belle coloration verte favorable à un bon dosage colorimétrique.

Ce mode de dosage rapide nous a paru suffisamment précis pour les recherches que nous avons à effectuer. Nous en avons donc entrepris l'étude systématique en vue de son application au dosage en bloc des stérols extraits de la levure de bière. Nous étudierons successivement : les corps à mettre en présence et leurs proportions, les stérols donnant la réaction, le temps de contact optimum, enfin les précautions à prendre pour son emploi.

Nous comparerons ensuite des solutions d'ergostérol et de zymostérol. Enfin, après avoir donné la sensibilité de la réaction, nous donnerons une technique de dosage que nous critiquerons dans nos conclusions.

Corps à mettre en présence et leurs proportions. — Il est classique d'avoir un mélange contenant au moins 20 % d'anhydride acétique pour avoir une bonne coloration. Nous avons exagéré la précaution en employant parties égales de solution chloroformique (ou acétonique) et d'anhydride acétique : en général 5 cm³ de chaque, auxquels nous ajoutons 2 gouttes d'acide sulfurique concentré.

Il nous était utile pour nos recherches ultérieures de chercher si l'on pouvait remplacer le chloroforme par l'acétone.

R. MEESEMAECKER et H. GRIFFON avaient déjà remarqué que la réaction se produisait. Nous avons observé de plus que pour des teneurs en ergostérol variant de 0,1 à 2 milligrammes (l'ordre de grandeur de nos recherches) la réaction à l'acétone (c'est-à-dire en remplaçant le chloroforme par de l'acétone pur et anhydre) permettait un excellent dosage colorimétrique.

Stérols donnant la réaction. — L'ergostérol et le zymostérol donnent cette réaction ; tous les auteurs étudiant ces stérols l'ont signalé et nous avons pu le vérifier nous-mêmes.

Pour WIELAND et ses élèves, le néostérol, le faecostérol et l'asco-

stérol donnent une réaction du même type que celle de l'ergostérol et du zymostérol, à savoir coloration rose passant au bleu puis au vert plus ou moins rapidement. L'anastérol donne une coloration rose qui passe au bleu puis très longtemps après au rouge cerise ; l'épistérol donne une coloration rose qui devient bleue et olive, puis très longtemps après rouge cerise ; l'hypostérol donne une coloration carmin puis violette virant au vert olive (113, 114, 115).

Temps de contact pour un bon dosage colorimétrique. — Il importait de connaître le temps de contact nécessaire pour obtenir une bonne coloration verte et le temps pendant lequel elle restait stable.

Nous avons pour cela comparé dans le temps la coloration obtenue avec un stérol à celle d'un témoin stable qui n'a pour le moment d'autre utilité que de fournir une teinte invariable dans le temps, et nous avons pris une solution à environ 1/10 de sulfate de nickel.

Puis nous mettons en réaction les corps suivants :

1 cm³ de solution $\frac{1}{1.000}$ de stérol (1 gr. de stérol et 1.000 cm³
de chloroforme),
5 cm³ de chloroforme,
5 cm³ d'anhydride acétique,
11 gouttes d'acide sulfurique

et nous obtenons les résultats suivants :

a) *Ergostérol.* — La teinte obtenue passe rapidement au rose, reste un peu plus longtemps au bleu et en 3 à 4 minutes se stabilise en un vert très comparable au sulfate de nickel. 15 minutes après environ la solution commence à jaunir et n'est plus bonne pour une appréciation colorimétrique.

b) *Zymostérol.* — Dans les mêmes conditions, le zymostérol donne une teinte qui passe par le rose, devient bleue, puis verte en se fonçant graduellement pour atteindre un maximum d'intensité au bout de 5 minutes environ, la teinte reste à peu près stable 3 à 4 minutes, puis jaunit et se détruit rapidement.

Nous n'avons pu essayer les autres stérols, n'en possédant pas d'échantillon.

VARIATION DE L'INTENSITÉ DE COLORATION AVEC LE TEMPS.

Minutes	Hauteur de liquide donnant une égale coloration (en mm.)	
	Zymostérol	Témoin. Solution du sulfate de nickel 1/10 environ
1.....	27	20
2.....	20	»
3.....	12	»
4.....	10	»
5.....	8,7	»
6.....	8,7	»
7.....	8,8	»
8.....	9,4	»
10.....	10	»
15.....	10	»

Ce tableau ne donne évidemment que l'ordre de grandeur de l'intensité de coloration; nous avons employé pour le dresser un zymostérol ($\alpha_D = +40^\circ$) et sans aucun doute les chiffres varieraient avec un zymostérol plus pur.

Précaution à prendre pour l'emploi de la réaction. — Pour R. MEESEMACKER et H. GRIFFON (69) tout se passe comme si la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD était conditionnée par un phénomène de déshydratation. Ils remarquent en outre que le chloroforme n'est pas indispensable et qu'il peut être remplacé par de nombreux autres solvants : seuls les alcools ne donnent aucune coloration.

Nous avons en effet remarqué nous-même que l'eau diminuait ou empêchait la réaction de se produire. Il faudra donc opérer sur des solutions chloroformiques d'extraits absolument exempts d'eau. Nous avons remarqué de plus que la réaction était très légèrement diminuée lorsque l'on employait le chloroforme anesthésique Codex. L'alcool même en faible proportion (5 %) possède donc un pouvoir inhibiteur sur la réaction.

Aussi nous employons du chloroforme rigoureusement pur.

Comparaison d'une solution d'ergostérol et d'une solution de zymostérol. — Cette comparaison nous a toujours donné des chiffres éminemment variables suivant les conditions expérimentales. Toutefois ces chiffres gravitaient nettement autour du rapport $\frac{10}{22}$, 10 représentant la hauteur de liquide de la solution d'ergostérol et 22 celle de

la solution de zymostérol, pour une même intensité de coloration. En gros il faut donc 2 gr. 2 de zymostérol pour donner la même teinte que 1 gr. d'ergostérol.

Les comparaisons ont été faites soit avec 5 cm³ des solutions au $\frac{1}{1.000}$ soit avec 5 cm³ des solutions à $\frac{5}{1.000}$, parties égales d'anhydride acétique et 2 gouttes d'acide sulfurique.

Limite d'utilisation de la réaction Liebermann. — Pour le zymostérol qui donne la teinte la plus faible, nous avons trouvé que 0 mgr. 05 de zymostérol dilué dans 5 cm³ de chloroforme additionnés de 5 cm³ d'anhydride acétique, et de deux gouttes d'acide sulfurique nous donnait une réaction à peine visible. Aussi considérons-nous la concentration de 1/200.000 comme l'extrême limite de la réaction. Pour l'ergostérol cette concentration permet encore le dosage colorimétrique et l'extrême limite de la réaction se trouve autour de $\frac{1}{500.000}$.

Technique du dosage. — Nous prenons à la pipette 5 cm³ de chloroforme contenant une partie de l'extrait ou une fraction de la solution témoin au $\frac{1}{1.000}$ d'ergostérol. Nous y ajoutons 5 cm³ d'anhydride acétique pur et nous agitons pour avoir un mélange homogène ; puis nous ajoutons deux gouttes d'acide sulfurique à 66° Baumé. Nous agitons et effectuons la lecture colorimétrique cinq minutes après addition d'acide sulfurique (La température moyenne du laboratoire est de + 20° centigrades).

CONCLUSION.

Par l'emploi de la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD et en opérant comparativement avec l'extrait de levure et une solution d'ergostérol, nous n'aurons qu'une idée des stérols, puisque le zymostérol donne une réaction 2,2 fois plus faible que l'ergostérol et que nous ne savons pas ce que donnent en intensité les stérols récemment découverts.

Nos chiffres de stérols totaux sont donc certainement trop faibles, mais puisque nous opérons toujours sur la même levure et le plus souvent par deux expériences comparatives effectuées dans le même

temps, nous pourrions toujours dire qu'un extrait contient plus de stérols qu'un autre.

D'autre part, la réaction de LIEBERMANN très sensible et à peu près spécifique des stérols nous permet d'opérer sur des extraits, à peine purifiés et de connaître donc immédiatement la proportion des stérols sans en perdre au cours des manipulations.

CHAPITRE II

Étude comparative de la solubilisation des stérols contenus dans la levure.

PARTIE THÉORIQUE

Nous avons étudié les solubilités des stérols de la levure dans divers solvants communs, à partir de la levure fraîche et de la levure sèche.

Recherchant une technique d'extraction pratique, nous n'avons pas employé les solvants volatils et dangereux tels que l'éther, l'éther de pétrole ou le benzène, ni les solvants trop coûteux. Ces divers solvants n'offrent d'ailleurs aucun avantage, soit au point de vue dissolution des stérols, soit au point de vue traumatisme de la cellule, sur ceux que nous avons étudiés : acétone, chloroforme, alcool.

Dans ce chapitre nous constatons que la levure *fraîche* n'abandonne pas ses stérols à leurs solvants les meilleurs : acétone et chloroforme ; il faut l'action traumatisante de l'alcool sur les cellules pour extraire les stérols.

La levure *desséchée* au contraire cède ses stérols aux différents solvants employés, comme s'il y avait eu pendant la dessiccation une dissociation des combinaisons stéroliques.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

- PLAN : I. — Techniques employées ;
II. — Action des solvants sur la levure de bière fraîche ;
III. — Action des différents modes de dessiccation de la levure de bière.

I. — Techniques employées.

Dans les chapitres suivants, à moins d'indication contraire, toutes les expériences partent d'une prise d'essai de 20 gr. de levure de bière de panification pressée (marque SPRINGER, cette levure nous ayant été indiquée comme une des plus identiques à elle-même).

Extraits. — Nous avons déterminé les extraits par évaporation de la solution extractive au bain-marie bouillant, dans une capsule tarée que nous avons ensuite placée dans une cloche à vide contenant de l'anhydride phosphorique ; nous avons fait un vide de 6 mm. environ et après 48 heures nous avons pesé la capsule. Les chiffres des extraits sont donnés en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche.

Stérols totaux. — Nous avons dosé les stérols totaux par l'emploi de la méthode colorimétrique (colorimètre de DUBOSQ et réaction de LIEBERMANN). Les dosages ont été faits comparativement avec une solution chloroformique au millième d'ergostérol (1 gr. d'ergostérol et 1.000 cm³ de chloroforme), et nous avons employé les proportions suivantes :

Chloroforme contenant une partie de l'extrait à doser ou une fraction de la solution témoin d'ergostérol..	5 cm ³
Anhydride acétique pur	5 cm ³
Acide sulfurique à 66° Baumé	11 gouttes

La température était toujours voisine de + 20° centigrades et la lecture colorimétrique effectuée cinq minutes après addition de l'acide sulfurique et agitation. Dans les cas assez rares d'extraits très colorés, nous placions au-dessus du témoin un verre coloré en brun, donnant à celui-ci la même teinte initiale que l'extrait.

Les chiffres exprimés sont en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche. Cette technique qui, en valeur absolue, est loin d'être à l'abri de toute critique, s'est révélée suffisante pour des examens comparatifs. Et il sera toujours entendu que les chiffres donnés par cette méthode ne seront toujours que des chiffres utiles seulement pour la comparaison.

Stérols libres. — Nous avons seulement dosé les stérols libres précipités par le digitonoside suivant la méthode de H. PÉNAU et M^{lle} Z. HARDY (82) que nous décrivons ci-dessous :

Dans un tube à centrifuger séché et taré, nous introduisons 10 cm³ d'une solution alcoolique d'ergostérol = environ 0 gr. 015, 9 cm³ d'une solution de digitonoside à 1 % dans l'alcool à 90°, puis 2 cm³ d'eau distillée, le tout mesuré à 15°. Nous agitons le mélange avec une baguette de verre afin d'assurer son homogénéité parfaite. Nous lavons l'agitateur avec 5 ou 6 gouttes d'alcool à 95° et abandonnons le tube à la température du laboratoire (18°) pendant 18 heures.

Nous portons alors dans une centrifugeuse, et après un quart d'heure de rotation nous nous débarrassons par décantation du liquide surnageant, puis nous lavons le précipité (en le malaxant avec un agitateur) avec 4 cm³ de solvant E. A. C. de Caminade (acétone pur 73 cm³, eau 18 cm³, alcool absolu 9 cm³).

Nous centrifugeons à nouveau le liquide à 3.000 tours-minute environ, et nous mettons, après nouvelle décantation, le tube à sécher 24 heures dans le vide sur anhydride phosphorique.

1 gr. de complexe renferme environ 0 gr. 250 d'ergostérol-zymostérol. Ici encore le chiffre n'est pas exact puisque 1 gr. de complexe correspond à 0 gr. 269 de zymostérol, mais nous avons voulu, comme plus haut, exprimer tout en ergostérol, d'autant que le zymostérol s'altère très rapidement et le chiffre de 0 gr. 269 est très susceptible d'être abaissé.

II. — Action des solvants sur la levure de bière fraîche.

Nous avons indiqué dans la partie théorique de ce chapitre les raisons de commodité qui nous ont fait choisir les trois solvants communs : alcool, acétone, chloroforme. De plus, comme nous avons en vue la recherche des combinaisons : stérols-lécithides-protéides, ces trois solvants nous ont été utiles en raison de leur action spécifique. L'acétone dissout les stérols mais non les lécithides, le chloroforme dissout stérols et lécithides, enfin l'alcool coagule les protéides et dissout stérols et lécithides.

De ces trois solvants, seul le chloroforme n'est pas miscible à l'eau, et, plutôt que de les classer en solvants miscibles et non miscibles à l'eau, nous préférons faire leur étude dans l'ordre de leur action théorique sur les constituants de la levure : acétone, chloroforme, alcool.

α) ACÉTONE.

Nous avons pour ce solvant pratiqué trois séries d'expériences :

Série I. — Nous avons placé les 20 gr. de levure fraîche dans la nacelle d'un appareil de KUMAGAWA et nous les avons traités au bain-marie par 150 cm³ d'acétone anhydre bouillant pendant 6 à 8 heures. Nous obtenons les chiffres suivants avec nos techniques normales de dosage (chiffres en milligrammes) :

Expériences	I	II	III	IV	Techniques
Extraits	469	502	»	»	B.-M. vide sur P ² O ⁵ .
Sterols libres . . .	»	»	1,3	1,1	PÉNAU-HARDY.
Sterols totaux ..	2,5	10,4	5,5	5	LIEBERMANN.

Craignant, ce qui en fait a lieu, que ces chiffres n'expriment pas seulement l'action de l'acétone sur la levure de bière fraîche, mais aussi l'action de l'acétone sur la levure déshydratée à l'acétone, nous avons entrepris les expériences suivantes :

Série II. — Nous avons soigneusement mélangé au mortier 20 gr. de levure fraîche et 100 cm³ d'acétone et nous avons porté ce mélange dans un ballon rond de 500 cm³ que nous avons placé sur un bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Nous avons essoré le mélange à la trompe sur Büchner, distillé l'acétone au bain-marie et repris le résidu par 20 cm³ de chloroforme.

Toutes les expériences de cette série nous ont donné seulement 1 mgr. de stérols totaux pour chaque prise d'essai (dosage colorimétrique).

Série III. — Dans ces derniers essais nous avons fait agir l'acétone par petites fractions de façon à suivre autant que possible la déshydratation. Nous avons traité 20 gr. de levure fraîche par 20 cm³ d'acétone bouillant 5 minutes au B.-M. Nous avons centrifugé, décanté l'acétone et pesé le vase contenant la levure. L'acétone décantée est évaporée et nous avons repris le résidu par le chloroforme et dosé les stérols totaux colorimétriquement, nous avons ainsi obtenu un chiffre *a*. Au résidu de levure, nous avons ajouté de nouveau 20 cm³ d'acétone et recommencé, nous avons obtenu alors un second chiffre *b*, et ainsi de suite.

Nous avons constaté que presque toute l'eau est entraînée dans la première expérience, ensuite le poids de la levure varie trop peu

pour qu'on puisse le suivre dans les conditions expérimentales données.

Pour une moyenne de quatre expériences les chiffres des stérols totaux dosés colorimétriquement gravitaient autour des suivants :

a : 1 mgr. b : 2 à 3 mgr. c : 1 mgr. d : moins de 1 mgr.

Si on déshydrate complètement la levure en la laissant 18 heures en contact avec 60 cm³ d'acétone, on obtient 12 mgr. de stérols totaux, et on en obtient 10 en faisant agir ensuite 5 minutes 20 cm³ d'acétone bouillant sur cette levure pulvérisée.

De toutes ces expériences, nous croyons pouvoir conclure en disant que l'acétone bouillant n'enlève à la levure de bière fraîche que de très faibles quantités de stérols, et déjà nous apercevons l'importance de la dessiccation.

β) CHLOROFORME.

Le chloroforme nous paraissait particulièrement intéressant en raison de son action spéciale plasmolytique sur les cellules. Sur le mécanisme de cette action, nous ne pouvons mieux faire que de reproduire l'essentiel des conclusions d'un travail de Pierre PICARD étudiant l'action de vapeurs saturantes de chloroforme sur quelques cellules végétales (ail, orge, pois, etc.) (83) :

« Le cytoplasme subit très rapidement la plasmolyse puis la structure vacuolaire se transforme, les vacuoles se confondent et l'aspect général devient réticulo-alvéolaire, en même temps que le cytoplasme devient granuleux. Finalement ce dernier est entièrement transformé en « boules sarcodiques ». Parallèlement il y a lipophanérose ; il apparaît dans la cellule de grosses inclusions osmiophiles graisseuses, constituées par les graisses primitivement masquées par leur liaison au cytoplasme ». Les modifications du chondriome et du noyau sont variables, mais toujours le noyau se contracte.

Si la cellule de levure se comporte d'une façon analogue aux autres cellules végétales, nous étions en droit de penser que le bouleversement cytoplasmique serait favorable à une extraction des stérols et nous avons conduit l'expérience suivante :

Dans un grand ballon, fermé par un tampon de coton, nous avons mis en contact pendant une heure 20 gr. de levure fraîche et 10 cm³ de chloroforme. Grâce à quelques agitations le mélange a acquis

au bout de ce temps une consistance homogène et visqueuse. Nous ajoutons alors 100 cm³ de chloroforme et portons 30 minutes au bain-marie bouillant. Durant cette ébullition nous avons nettement l'impression que le chloroforme « ne mouille pas la masse visqueuse », et ne pouvant ni filtrer, ni essorer, et même très difficilement centrifuger, nous sommes obligés de séparer le chloroforme par décantation. Nous traitons à nouveau la masse résiduelle par 20 cm³ de chloroforme. Nous évaporons les liqueurs chloroformiques rassemblées et effectuons un dosage colorimétrique. Nous trouvons seulement 0 mgr. 4 pour la prise d'essai de 20 gr.

Donc, malgré la plasmolyse qu'il provoque, le chloroforme, même bouillant, n'enlève à la levure de bière fraîche que des traces de stérols.

MIRANDE a décrit dans les cellules du lis blanc des inclusions sous le nom de stérinoplastes (74). Ceux-ci sont constitués d'un corps central composé de stérides enveloppés d'un manteau dont la couche externe très mince résiste aux solvants des lipoides. Existe-t-il dans les levures des stérinoplastes non décelables au microscope ? ou bien les stérols sont-ils dans la membrane à l'état de combinaisons non dissociables par le chloroforme ? Telles sont les questions que l'on peut poser après cette expérience.

γ) ALCOOL A 95° et 90°.

Nous avons pratiqué deux séries d'expériences parallèles aux deux premières séries effectuées pour l'acétone.

Série I. — Nous avons placé les 20 gr. de levure fraîche dans la nacelle d'un appareil de KUMAGAWA et les avons traités pendant 6 heures par 150 cm³ d'alcool à 90° bouillant. Après addition d'eau, épuisement du liquide par deux fois 50 cm³ d'éther, évaporation de l'éther et reprise du résidu par 20 cm³ de chloroforme, nous avons obtenu par nos techniques habituelles de dosage :

Expériences	I	II	Techniques
Extraits	1.482	1.423	B.-M. vide sur P ² O ⁵ .
Stérols libres	5,5	5,1	PÉNAU-HARDY.
Stérols totaux	28,8	27	LIEBERMANN.

Comme pour l'acétone, ces chiffres expriment aussi l'action de l'alcool sur la levure déshydratée à l'alcool.

Série II. — Nous avons soigneusement mélangé au mortier 20 gr. de levure fraîche avec 200 cm³ d'alcool à 95°, nous avons porté ce mélange dans un ballon rond de 500 cm³ que nous avons placé sur un bain-marie bouillant, pendant une heure. Nous avons traité l'alcool comme dans la série précédente et nous avons trouvé des chiffres qui variaient autour de 12 mgr. de stérols totaux.

L'alcool possédant un pouvoir déshydratant moins fort que l'acétone, il nous a paru inutile de répéter la série III pour pouvoir conclure par comparaison des séries II que l'alcool enlève à la levure fraîche de grandes quantités de stérols. Toutefois des expériences ultérieures nous ont prouvé que l'alcool n'enlevait pas tous les stérols : WINDAUS l'avait reconnu depuis longtemps, puisque sa technique emploie la levure fraîche et l'alcool sodé suivi d'un épuisement à l'éther (117).

III. — Action des différents modes de dessiccation de la levure de bière.

Dans ses recherches sur les phénomènes d'oxydo-réduction, R. FABRE a déjà montré l'influence prépondérante de la dessiccation et du mode de dessiccation sur la solubilisation des dérivés sulfhydrylés de la levure (26). Nous nous sommes proposé d'effectuer des recherches parallèles en ce qui concerne les stérols. Nous étudierons successivement la levure desséchée dans le vide sur anhydride phosphorique, puis la levure desséchée à l'acétone bouillant, et nous essaierons nos solvants sur la levure ainsi préparée.

α) LEVURE DESSÉCHÉE DANS LE VIDE SUR ANHYDRIDE PHOSPHORIQUE.

La levure est portée au vide profond (5 mm.) sur anhydride phosphorique, pendant 48 heures, puis broyée, passée au tamis n° 50 et reportée 48 heures au vide sur anhydride phosphorique.

a) *Acétone.* — Une quantité de levure sèche correspondant à 20 gr. de levure fraîche est épuisée au KUMAGAWA pendant 6 heures par 200 cm³ d'acétone bouillant. Nous obtenons avec nos techniques habituelles :

Extrait sec	42 mgr.
Stérols libres	0 mgr. 8
Stérols totaux	3 mgr. 3

Dans une autre expérience, nous avons dilué le même poids de levure avec 50 gr. de sable fin lavé et, les opérations de dessiccation pratiquées comme plus haut, nous avons obtenu 9 mgr. de stérols totaux.

L'acétone peut donc enlever à la levure de bière sèche des quantités déjà notables de stérols.

b) *Chloroforme*. — La levure a été diluée avec 50 gr. de sable très fin et après dessiccation portée 5 heures à l'agitateur mécanique avec 200 cm³ de chloroforme. Le dosage donne environ 26 mgr. de stérols totaux. C'est un résultat remarquable, mais la finesse du sable employé n'a pas été sans conditionner cette expérience et de cela nous reparlerons plus loin.

c) *Alcool à 90°*. — Une quantité de levure sèche correspondant à 20 gr. de levure fraîche est épuisée au Kumagawa pendant 6 heures par 200 cm³ d'alcool à 90°.

Nous obtenons :

Extrait sec	166 mgr.
Stérols libres	1 mgr.
Stérols totaux	10 mgr. 7

L'alcool enlève de notables quantités de stérols à la levure sèche, mais beaucoup moins qu'à la levure fraîche.

β) LEVURE DESSÉCHÉE A L'ACÉTONE BOUILLANT.

Ce mode de dessiccation ouvre la voie aux épuisements successifs. En effet le solvant, que nous ferons agir après l'acétone, n'enlèvera que ce que l'acétone aura laissé.

Dans chacune des expériences suivantes, la levure fraîche, après un épuisement acétonique de six heures au Kumagawa, est séchée à l'air puis dans le vide sur anhydride phosphorique ; elle est enfin pulvérisée au mortier et passée au tamis n° 50.

a) *Alcool à 90°*. — Voici les résultats moyens d'épuisements par l'alcool, six heures au Kumagawa :

Extrait alcoolique	720 mgr.
Stérols totaux	25 mgr.

Après l'acétone, l'alcool entraîne donc de fortes quantités de stérols.

b) *Chloroforme*. — Un épuisement identique au précédent nous donne les chiffres suivants :

Expériences	I	II	III	
Extrait chloroformique .	21	»	19	en milligrammes pour
Stérols totaux	< 0,1	0,4	0,8	20 gr. de levure.

L'action du chloroforme est sensiblement nulle dans ces conditions (moins de 1 mgr. de stérol extrait, alors que dans une expérience identique l'alcool en enlève 25 mgr.).

c) *Acétone avec traitement mécanique*. — En faisant cette expérience nous avons voulu avoir une idée de la durée d'une extraction à l'acétone et de l'influence d'une repulvérisation fréquente de la levure.

Nous avons pris les 20 gr. de levure desséchée à l'acétone comme il est indiqué au début de ce paragraphe. Sans pulvérisation, nous les avons traités par 100 cm³ d'acétone pendant dix minutes au bain-marie bouillant ; nous n'avons enlevé que des traces infimes de stérols (1/10 de mgr.). Nous avons alors pulvérisé au mortier cette levure, qui ne cédait plus rien à l'acétone, et nous l'avons traitée par 50 cm³ d'acétone pendant 10 minutes au bain-marie bouillant ; pour deux expériences parallèles nous obtenons 22 mgr. et 22 mgr. de stérols totaux. Un deuxième, puis un troisième traitement identique nous donnent respectivement 12 mgr. 8 et 8 mgr. 8 puis 3 mgr. et 6 mgr. 8. Si nous pulvérisons alors grossièrement les chiffres tombent à 2 mgr. pour remonter à 4 mgr. par une meilleure pulvérisation.

Résumons en un tableau les chiffres précédents :

Extraction	1	2	3	4	5	6	Total
Expérience A	22	12,8	3	2	4	1	44,8
Expérience B	22	8,8	6,8	2	4	1	44,6

Stérols totaux en milligrammes pour deux expériences parallèles (extraits acétoniques repris par 20 cm³ de chloroforme et dosage sur une partie aliquote).

En examinant l'expérience précédente, nous remarquons :

- 1° Que l'acétone a enlevé des quantités considérables de stérols ;
- 2° Que malgré des conditions expérimentales absolument identiques, il y a pour le deuxième extrait un gros écart entre les expé-

riences *A* et *B*, écart presque exactement récupéré pour le troisième extrait.

3° Que la pulvérisation exerce une action incontestable sur l'extraction des stérols (4^e et 5^e extraits). On peut même penser que les écarts relatifs au deuxième extrait étaient dus à une différence de puissance dans la pulvérisation.

4° Qu'une extraction complète à l'acétone est très longue.

On peut penser, et un examen microscopique permet de le vérifier, que les cellules adhèrent massivement les unes aux autres, et il semble indispensable que chaque cellule soit isolée (limite pratiquement impossible à obtenir) pour que le solvant ait son maximum d'action.

En résumé, ce chapitre a attiré notre attention sur l'action prédominante de l'acétone et sur la nécessité de diviser les cellules et nous allons étudier dans le chapitre suivant les moyens mécaniques susceptibles d'activer cette division.

CHAPITRE III

Recherches en vue de l'établissement d'une technique d'extraction totale des stérols de la levure de bière.

PARTIE THÉORIQUE

Lorsque nous avons cherché à extraire les stérols de la levure de bière, nous nous sommes aperçu qu'il était très facile d'en retirer une quantité notable par action des solvants organiques. Nous avons constaté aussi que la levure sèche était plus attaquable que la fraîche, ou, tout au moins, fournissait une meilleure extraction en stérols.

Cherchant à extraire toujours plus de stérols et à retirer si cela était possible la totalité de ceux contenus dans la levure, nous avons pensé qu'en mélangeant du plâtre ou du sulfate de sodium anhydre avec de la levure fraîche nous emprisonnerions celle-ci dans un réseau cristallin si fin qu'il ferait éclater les cellules, ou déformerait leurs parois en les rendant plus perméables aux solvants. L'expérience a répondu à notre attente et des séries de longues manipulations nous ont permis de constater que la levure au plâtre ou au sulfate de sodium donnait une quantité de stérols supérieure à la levure fraîche ou desséchée seule dans le vide sur anhydride phosphorique. Nous avons même établi que la levure au sulfate de sodium donnait des résultats supérieurs à la levure au plâtre.

Poursuivant la confirmation de notre thèse, nous avons constaté que la levure au sulfate de sodium donnait un meilleur ren-

dement que la levure diluée avec du sable fin et passée au même tamis. Enfin pour éliminer complètement l'hypothèse de la dilution, nous avons mélangé finement de la levure pressée avec de la terre d'infusoires, poudre impalpable, convenablement lavée, et nous avons passé chaque produit au tamis très fin.

Cette fois l'extraction de la levure à la terre d'infusoires s'est révélée de beaucoup supérieure à la levure au sulfate de sodium anhydre.

De cette première série de faits nous croyons pouvoir conclure :

1° Avant ou pendant l'extraction les cellules de levure adhèrent facilement les unes aux autres en formant de petites masses qui se laissent difficilement pénétrer par les solvants. A mesure que nous diluons la levure dans une matière inerte, que nous tendons à séparer les cellules une à une, nous augmentons les rapports réciproques de la levure et du solvant, et nous accroissons la quantité de produits extraits.

Enfin d'une part les résultats fort différents obtenus avec des séries de deux expériences en tous points semblables, d'autre part l'action certaine du broyage après chaque expérience, conséquence de la conclusion précédente (il a fallu 4 broyages pour obtenir même avec la terre d'infusoires au bout de huit heures une extraction complète à l'acétone) nous permettent de formuler cette conséquence pratique :

2° Même en divisant il est indispensable, si l'on veut obtenir une extraction complète et rapide, d'agiter ou de malaxer la levure pendant l'extraction.

En un mot pour avoir la meilleure extraction, il suffit d'augmenter les surfaces de contact et de les renouveler.

Poursuivant notre étude nous avons cherché si la plasmolyse des cellules, provoquée soit avec le chloroforme agissant sur la composition de la membrane, soit avec le saccharose en poudre agissant par différence de pression osmotique, pouvait avoir une influence quelconque sur l'extraction des stérols.

Il se pouvait que la plasmolyse augmentât la perméabilité de

la membrane, et fournit ultérieurement une plus grande extraction en stérols.

Nous avons pu voir qu'il n'en était rien et qu'au contraire les levures accompagnées de leur lysats se colmataient en quelque sorte avec la terre d'infusoires et fournissaient une extraction en stérols tout au plus égale à la levure au sulfate de sodium ; donc :

3° Les cellules de levure plasmolysées avant l'extraction ne nous fournissent pas plus de stérols que les cellules de levure n'ayant pas subi la plasmolyse préalable.

Enfin nous avons cherché en dosant les lécithides et le phosphore lécithidique des extraits une preuve à l'appui d'une combinaison probable stérols-lécithides. Cette question sera étudiée dans le chapitre suivant, mais pour ne pas compliquer notre travail par des redites de tableaux nous avons indiqué dans ce chapitre, réservé aux stérols, les méthodes de dosages du phosphore et des lécithides et les quantités trouvées à chaque expérience où nous avons fait ces dosages.

Nous disons dès maintenant que nous n'avons pas trouvé de rapport fixe $\frac{\text{stérols}}{\text{lécithides}}$.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PLAN : A. — Techniques employées.

B. — Essais comparatifs d'extraction des stérols avec les levures fraîches, sèches ou broyées selon A. Supériorité de la technique au sulfate de sodium.

C. — Comparaison d'extractions stéroliques avec la technique au sulfate de sodium et la méthode de WINDAUS et GROSSKOPF.

D. — Hypothèse sur l'état des cellules de levure pendant l'extraction. La levure diluée avec la terre d'infusoires donne une extraction supérieure à celle au sulfate de sodium anhydre. Courbes d'extraction.

E. — Inutilité de la plasmolyse préalable.

F. — Données en vue de l'établissement d'une technique d'extraction simplifiée : division et broyage.

A. — Techniques employées.

a) *Extraction en employant le sulfate de sodium anhydre ou le plâtre.*

A la suite des recherches du chapitre précédent nous avons mis au point une nouvelle technique d'extraction qui comprend les manipulations suivantes :

α) **PÉPARATION DE LA POUDRE A EXTRAIRE :** Les proportions des corps à mettre en présence sont à peu près les suivantes :

Levure de bière pressée (70 % eau env.)	40 gr.
Plâtre ou sulfate de sodium anhydre.....	100 gr.
Eau distillée	q. s. (en général qq. cm ³)

Nous pistons le tout soigneusement au mortier, de façon à obtenir une masse pilulaire de consistance homogène. Nous laissons cristalliser lentement, pulvérisons grossièrement et portons 12 heures dans le vide sur anhydride phosphorique. Le mélange est alors pulvérisé finement au mortier, de façon que toute la poudre passe entre les mailles d'un tamis d'un numéro au moins égal à 50.

Nous reportons dans le vide sur anhydride phosphorique, vide poussé à 6 millimètres de mercure. Nous laissons jusqu'à poids constant, en général 48 heures. L'avantage d'un vide poussé et rapide, est d'empêcher les transformations cellulaires de se produire sous l'influence de l'eau et du sulfate de sodium (échanges osmotiques, modification de la vie cellulaire).

Le mélange est alors prêt à subir l'action des différents solvants.

β) **ÉPUISEMENT :** La poudre est épuisée soit à l'aide de l'appareil de KUMAGAWA-SUTO (61') soit par l'appareil de M. FRANÇOIS (29) ; ces deux modes d'épuisements nous ayant donné sensiblement les mêmes résultats pour un temps d'au moins 8 heures d'épuisement, ont été employés indifféremment.

Chaque solvant doit être utilisé pendant au moins 8 heures.

Après l'action de chaque liquide extractif et pour éviter les erreurs dues à l'action d'un mélange de solvants, la poudre est

soigneusement séchée d'abord à l'air libre, puis au vide phosphorique (6 mm.) pendant 24 heures au moins.

Nous utilisons ainsi successivement : *acétone*, *chloroforme*, *alcool* à 90°, et enfin *alcool sodé*, suivant la technique de WINDAUS (117).

b) *Dosage des stérols.*

L'extraction des stérols des différents extraits obtenus, a été effectuée soit par simple affusion d'éther bouillant, soit par agitation dans une ampoule à décantation d'un mélange d'éther et d'extrait émulsionné dans l'alcool à 40° environ. Le dosage des stérols totaux est fait en utilisant la réaction de LIEBERMANN suivant la technique de GRIGAUT pour le cholestérol dans le sang, dosage opéré comparativement avec une solution chloroformique témoin, contenant 1 ‰ d'ergostérol. Nous avons aussi employé la technique au digitonoside de H. PÉNAU et M^{lle} Z. HARDY (82) pour le dosage des stérols libres.

Le détail de ces techniques a déjà été indiqué dans un chapitre précédent (chapitre II). La critique en a été faite à la fin du chapitre I.

c) *Dosage des lécithides et du phosphore des lécithides.*

Les lécithides sont extraits à l'éther bouillant puis précipités comme l'indique NERKING (75) par de l'acétone contenant une petite quantité de solution alcoolique saturée de chlorure de magnésium (qui agit comme sel neutre contribuant à la précipitation des lécithides), soit 2 cm³ de cette solution pour 100 cm³ d'acétone et 50 cm³ de solution étherée de lécithide. Le phosphore de ces précipités est ensuite dosé soit par la méthode de SØRENSEN mise au point par MACHEBŒUF, soit mieux par la technique de COPAUX, telle que l'indique M^{me} HINGLAIS.

α. — MÉTHODE SØRENSEN-MACHEBŒUF (97).

Nous avons très légèrement modifié la méthode de M. MACHEBŒUF pour le dosage du phosphore dans le sang, décrite dans un article auquel nous faisons quelques emprunts (65).

1° *Destruction sulfonitrique des matières organiques* : Dans un petit matras de 30 cm³, nous mesurons avec soin une partie aliquote de l'extrait que nous évaporons, puis nous ajoutons 1 cm³ d'acide sulfurique concentré pur. Le

mélange est porté à l'ébullition par une petite flamme (sous une hotte). Après une dizaine de minutes nous laissons refroidir, ajoutons 1 cm³ d'acide nitrique fumant, et portons de nouveau à l'ébullition.

Si, lorsque les vapeurs nitreuses ont complètement cessé de se dégager, il apparaît une coloration brune, nous ajoutons de nouveau quelques gouttes d'acide nitrique fumant. Nous terminons la destruction jusqu'à décoloration complète ou simple persistance d'une faible teinte jaune paille.

2° *Précipitation du phosphomolybdate d'ammoniaque* : Nous laissons refroidir complètement le liquide obtenu par destruction sulfonitrique, puis l'étendons avec 6 cm³ d'eau distillée ; nous ajoutons 2 cm³ d'une solution saturée de nitrate d'ammoniaque et portons le tube dans un bain-marie bouillant. Après une dizaine de minutes, nous introduisons dans le tube à essai 6 cm³ d'une solution à 5 % de molybdate d'ammoniaque, nous agitons et laissons séjourner encore 10 minutes exactement dans le bain-marie. Le précipité formé est rassemblé au fond du tube, une partie cependant surnage et grimpe le long des parois.

Nous laissons refroidir, puis ajoutons 5 cm³ environ d'alcool fort (90° ou 95°), agitons un peu, tout le précipité qui tendait à grimper est ramené dans le liquide et se décante rapidement avec le reste.

3° *Filtration*. — Nous filtrons sur fiole à vide surmonté d'un petit entonnoir garni d'une rondelle de porcelaine poreuse, nous rinçons le tube avec de l'alcool à 50° environ et nous décantons de la même façon. Nous opérons 5 à 7 lavages à l'alcool à 50° (5 cm³ environ à chaque lavage).

4° *Dissolution du précipité*. — Nous dissolvons le précipité dans quelques centimètres cubes d'ammoniaque diluée de 4 volumes d'eau, puis nous rinçons avec quelques centimètres cubes d'eau.

5° *Titrage du phosphomolybdate*. — La solution contenue dans la fiole conique est transvasée dans un Bécher de 200 cm³ environ, la fiole conique est rincée, les eaux de lavage versées dans le Bécher où se trouve maintenant rassemblé l'ensemble du phosphomolybdate en solution ammoniacale.

Nous ajoutons 10 cm³, exactement mesurés, d'une solution $\frac{N}{25}$ de soude puis portons à l'ébullition.

L'ammoniac libre se dégage ainsi que l'ammoniac fixé à l'acide phosphomolybdique et que déplace la soude. Après une quinzaine de minutes, tout l'ammoniac est chassée ; on s'en assure par un papier de tournesol rose humide mis dans les vapeurs sortant du col du ballon.

Il reste à titrer l'excès de soude non combiné à l'acide phosphomolybdique. Le titrage direct ne serait pas précis par suite de la présence du gaz carbonique.

Pour éviter cet inconvénient, nous versons 10 cm³ exactement mesurés d'acide sulfurique $\frac{N}{25}$ et portons de nouveau à l'ébullition pendant deux minutes environ, puis nous titrons, sans laisser refroidir, l'excès d'acide sulfurique par de la soude $\frac{N}{25}$, en présence de phénolphtaléine. Après l'apparition du virage, nous attendons 5 minutes, le virage disparaît, nous le faisons réapparaître et lisons le nombre de centimètres cubes de soude qui correspond à la quantité de soude combinée à l'acide phosphomolybdique.

En multipliant ce nombre de centimètres cubes par 0,0448, nous obtenons le poids en milligrammes de phosphore contenu dans la prise d'essai.

Le dosage peut être aussi effectué avec des solutions au vingtième normales et dans ce cas le coefficient est 0,056.

β. — MÉTHODE COPAUX-M^{me} HINGLAIS (8, 53).

On détruit les matières organiques comme dans la méthode précédente puis on introduit le liquide dans une ampoule de COPAUX.

Technique du dosage. — Nous introduisons dans l'ampoule :

- 10 cm³ de la solution à titrer ;
- 10 cm³ de liqueur sulfurique à 20 % ;
- 8 à 10 cm³ d'éther.

Nous agitons, puis introduisons encore :

10 cm³ de solution de molybdate de soude, à 140 ‰, par fractions successives de 3 cm³ environ, en agitant énergiquement après chaque affusion.

L'agitation énergique après chaque affusion est indispensable pour que le complexe phosphorique se rassemble bien.

De même, l'ordre dans lequel les réactifs sont versés dans l'ampoule doit être scrupuleusement respecté.

Nous centrifugeons. Le complexe phosphorique jaune se rassemble à la partie inférieure. Nous vérifions que la liqueur surnageante (couche aqueuse et couche éthérée) est parfaitement limpide et qu'aucun globule de liquide jaune n'est resté adhérent aux parois de l'ampoule, notamment au point de jonction du tube étroit avec la partie renflée. S'il est nécessaire, nous centrifugeons une seconde fois.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, quand l'agitation des liquides pendant l'opération a été énergique, le complexe se rassemble très facilement par une seule centrifugation d'une minute environ.

Après la centrifugation, nous lisons le volume occupé par le complexe. Celui-ci s'altère au bout d'un certain temps.

De la lecture du volume, nous déduisons la quantité de phosphore contenue dans la prise d'essai en nous reportant à une courbe construite à partir d'une solution étalon.

Ces deux dosages nous ont donné des résultats parfaitement comparables mais des deux techniques précédemment indiquées nous préférons la seconde qui est plus rapide que la première et tout aussi précise.

Lorsque nous avons commencé nos expériences nous ne possédions pas de centrifugeuse de COPAUX, c'est la raison pour laquelle nous avons employé la technique de MACHEBŒUF.

B. — Essais comparatifs d'extraction des stérols
avec de la levure fraîche, séchée ou broyée selon A.

a) *Supériorité de la technique au sulfate de sodium.*

Au risque de recommencer en partie les recherches préliminaires du chapitre précédent, nous avons traité le même jour :

- 1° 20 grammes de levure fraîche n'ayant subi aucune manipulation ;
- 2° 20 grammes de levure fraîche séchés dans le vide sur anhydride phosphorique, pulvérisés et passés au tamis n° 50 ;
- 3° 20 grammes de levure fraîche traités par la technique au sulfate de sodium et passés au tamis n° 50 ;
- 4° 20 grammes de levure fraîche traités par le plâtre et passés au tamis n° 50.

Nous avons épuisé ces différents produits d'abord par l'alcool à 90°, ensuite par l'acétone anhydre (expérience A) ; puis dans une autre série d'expériences nous avons renversé l'ordre des solvants et épuisé d'abord par l'acétone anhydre puis par l'alcool à 90° (expérience B). Nous nous sommes assuré que l'acétone était bien anhydre : en l'agitant avec une égale quantité d'huile d'olive, elle fournissait un mélange bien homogène et limpide.

Les poudres ont été épuisées 8 heures par chacun des solvants et soigneusement séchées et passées au tamis avant l'emploi d'un nouveau liquide.

La comparaison des tableaux A et B nous indique :

1° Qu'il est préférable d'employer les solvants dans l'ordre acétone puis alcool, plutôt que dans l'ordre alcool puis acétone. En effet le total des stérols extraits par la première méthode atteint 65 milligrammes contre 45 pour la seconde ;

2° Que les levures séchées au plâtre ou au sulfate de sodium fournissent une bien meilleure extraction ;

3° Que le rendement maximum est actuellement de 65 milligrammes de stérols totaux (exprimés en ergostérol) pour 20 grammes de levure fraîche ; soit 9 gr. 8 par kilo de levure sèche (la levure que nous employons contient cette fois 67 % d'eau après 24 heures à l'étuve).

TABLEAU A
(Alcool + acétone).

	Levure fraîche	Levure sèche	Levure + SO ² Na ²	Levure + plâtre	Techniques
Extrait alcoolique ...	1.482	166	772	504	B. M. vide sur P ² O ⁵ .
Extrait acétonique...	134	24	74	116	B. M. vide sur P ² O ⁵ .
Total des extraits ...	1.616	190	846	620	
Stérols totaux dans extraits alcooliques .	25	10	38	39	LIEBERMANN.
Stérols totaux dans extraits acétoniques :	20	3	4	3	LIEBERMANN.
Total des stérols ex- traits	45	13	42	42	
Lécithides (extrait al- coolique).....	102	5	84	40	NERKING-MACHEBEUF.

(Chiffres en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche pressée.)

TABLEAU B
(Acétone + alcool).

	Levure fraîche	Levure sèche	Levure + SO ² Na ²	Levure + plâtre	Techniques
Extrait acétonique...	502	12	330	272	B. M. vide sur P ² O ⁵ .
Extrait alcoolique ...	720	1.787	937	937	B. M. vide sur P ² O ⁵ .
Total des extraits....	1.222	1.799	1.267	1.209	
Stérols totaux dans ex- traits acétoniques...	10	3	47	50	LIEBERMANN.
Stérols totaux dans ex- traits alcooliques	25	30	15	15	LIEBERMANN.
Total des stérols ex- traits	35	33	62	65	
Lécithides (extrait al- coolique)	120	292	130	150	NERKING-MACHEBEUF.

(Chiffres en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche pressée.)

Il est toujours entendu que tous les chiffres cités représentent les stérols totaux exprimés en ergostérol et constituent de simples repères.

b) *Inutilité de l'extraction chloroformique.*

Prenant l'acétone comme premier solvant, nous avons voulu voir si nous ne pourrions pas remplacer l'alcool par le chloroforme ou tout au moins si le chloroforme n'enlèverait pas la plus grande partie de ce qu'aurait pu enlever l'alcool.

Nous avons cette fois fait deux extractions acétoniques consécutives de 8 heures de façon à retirer tout ce qui pouvait être soluble dans ce solvant, puis en suivant la technique habituelle nous avons traité 8 heures par le chloroforme et 8 heures par l'alcool à 90°. Nous avons obtenu le tableau ci-après :

TABLEAU C
Acétone. Chloroforme. Alcool.

	Levure fraîche	Levure + SO ₄ Na ²	Levure + plâtre	Techniques
1 ^o Extrait acétonique .	426	188	108	B. M. vide sur P ² O ⁵ .
2 ^o Extrait acétonique .	43	4	9	B. M. vide sur P ² O ⁵ .
Extrait chloroformique	21	37	16	B. M. vide sur P ² O ⁵ .
Extrait alcoolique	427	257	81	B. M. vide sur P ² O ⁵ .
Total des extraits.	917	483	214	B. M. vide sur P ² O ⁵ .
Stérols totaux acétoni- ques	2,5	32,5	16,2	LIEBERMANN.
Stérols totaux chloro- formiques	ε	0,6	0,5	LIEBERMANN.
Stérols totaux alcool- iques	10	5	2,5	LIEBERMANN.
Total des stérols ex- traits	12,5	38,1	19,2	LIEBERMANN.

(Chiffres en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche, stérols exprimés en ergostérols).

Le chloroforme n'enlève donc que des traces de stérols et son action est pratiquement inutile.

De plus cette expérience nous enseigne l'inconstance des chiffres d'extractions : les chiffres obtenus pour les stérols dans l'expérience C sont plus bas que ceux de l'expérience B. Ici notre chiffre maximum d'extraction n'est plus que 38 mgr. 1 pour 20 grammes de levure fraîche, soit 5 gr. 8 par kilo de levure sèche (20 gr. de levure fraîche = 6 gr. 6 de levure sèche).

Nous croyons pouvoir expliquer cette différence par un malaxage moins poussé de la levure et de la substance divisante. Et déjà il nous semble que l'action du sulfate de sodium anhydre doit être une action de division.

*c) Rejet de l'hypothèse dilution
pour l'action du sulfate de sodium anhydre.*

A la suite de la conclusion précédente, on peut se demander si l'épuisement plus poussé que l'on obtient avec le sulfate de sodium (ou le plâtre) n'est pas dû à une simple dilution de la poudre de levure, permettant ainsi une extraction plus complète. Pour réfuter cette objection nous avons conduit l'expérience suivante dans laquelle une partie de la levure a été diluée avec une matière inerte (sable) et l'autre avec le sulfate de sodium.

1^o Nous avons pris du sable de rivière convenablement lavé par les solvants que nous employons : acétone, chloroforme, alcool. Ce sable réduit au mortier en poudre très fine, est malaxé avec de la levure pressée à raison de 20 grammes de levure pour 50 grammes de sable. Le mélange est porté au vide phosphorique pendant 12 heures, puis broyé à nouveau, passé au tamis n^o 50, reporté au vide phosphorique 48 heures. Nous l'épuisons alors pendant 8 heures dans l'appareil de M. FRANÇOIS.

2^o Parallèlement nous avons pris 20 grammes de la même levure, nous les avons malaxés avec 50 grammes de sulfate de sodium, avons ajouté suffisamment d'eau pour permettre la prise théorique du sulfate de sodium et nous avons continué comme pour le 1^o.

Nous n'avons pas essayé le plâtre car, outre que le sulfate de sodium nous procurait des résultats à peu près identiques, les poudres obtenues avec le sable ou le sulfate de sodium anhydre occupent sensiblement le même volume, tandis que la poudre au plâtre occupe une fois et demie chacun des volumes précédents.

Les chiffres obtenus sont résumés dans le tableau D suivant et, l'on aperçoit très bien que la levure au sulfate de sodium fournit une extraction stérolique bien supérieure à celle au sable.

TABLEAU D

Solvants	Corps dosés	Levure + sable	Levure + SO ₄ Na ₂	Techniques
Acétone	stérols libres	0,5	8,5	PENAU-HARDY.
	stérols totaux	9,0	18,7	LIEBERMANN.
Chloroforme ..	stérols libres	1,0	2,6	LIEBERMANN.
	phosphore léci- thidi- que	0,08	0,1	MACHEBŒUF.

(Stérols en milligrammes d'ergostérol pour 20 gr. de levure fraîche.)

Il se confirme donc bien que le diluant de choix pour l'extraction de la levure est le sulfate de sodium anhydre employé comme nous l'avons indiqué. Mais cette technique donnant des chiffres variables n'est pas encore au point, et doit être perfectionnée.

Toutefois nous avons voulu nous assurer, si telle quelle, elle présentait un intérêt comparativement à d'autres méthodes d'extraction et ceci fait l'objet des deux paragraphes suivants.

C. — Comparaison d'extractions stéroliques avec la technique au sulfate de sodium et la méthode de Windaus-Grosskopf.

Partant d'un même bloc de levure SPRINGER pressé, nous avons poursuivi parallèlement quatre extractions, deux suivant la technique de WINDAUS et deux suivant notre méthode au sulfate de sodium anhydre. Pour les premières nous avons pris 100 gr. de levure fraîche par expérience et pour les secondes 10 gr. seulement.

Pour la commodité des comparaisons, tous les résultats exprimés dans le tableau suivant sont rapportés à 20 gr. de levure fraîche pressée, qui ont toujours constitué notre unité de prise.

La levure au sulfate de sodium anhydre, après avoir été traitée par les trois solvants successifs, acétone, chloroforme (malgré sa faiblesse d'action, nous avons employé ce solvant de façon à obtenir la totalité des stérols) alcool, a été séchée puis introduite dans un ballon rond avec de l'alcool sodé dans les proportions indiquées par WINDAUS et GROSSKOPF, et le mélange a été traité comme ils l'indiquent (117) suivant la technique ci-après :

(Toutes les proportions ont été réduites au $\frac{1}{20}$).

« Dans un grand mortier de porcelaine d'environ 5 litres on malaxe 2 kilos de levure pressée avec 2 litres d'alcool à 95° ; le tout est ensuite chargé dans un ballon rond de 5 litres et additionné d'une solution aqueuse concentrée de 400 gr. d'hydroxyde de sodium, puis encore de 1 litre d'alcool.

Le mélange chauffé au B.-M. pendant 3 h. est versé dans un grand entonnoir de porcelaine et fortement essoré, le résidu insoluble est réintroduit dans le ballon et mis à bouillir avec de l'alcool et à nouveau filtré. Les filtrats alcooliques sont concentrés au demi puis additionnés d'un égal volume d'eau et épuisés trois fois profondément dans une ampoule à décantation de 5 litres avec beaucoup d'éther.

Pour éviter la formation d'une émulsion trop ennuyeuse on doit remplir l'ampoule en faisant couler l'éther le long de la paroi. L'extrait éthéré jaune d'or est lavé avec de l'eau chlorhydrique très faible et séché au sulfate de sodium anhydre. Le reste insoluble, qui se trouve dans l'entonnoir en porcelaine, contient encore de l'ergostérol et est extrait à l'éther par épuisement dans un Soxhlet. Les extraits éthérés ainsi obtenus ont été séchés pareillement avec du sulfate de sodium anhydre. Les solutions éthérées sont rassemblées et évaporées au B.-M. Elles laissent une huile jaune clair qui se solidifie en une bouillie cristalline analogue au miel. »

WINDAUS continue en donnant la technique à suivre pour obtenir de l'ergostérol complètement pur.

Mais puisque nous opérons comparativement par dosages colorimétriques dans des conditions identiques il nous était inutile de pousser la purification des stérols. Aussi nous avons repris la bouillie cristalline précédente par du chloroforme et nous y avons dosé les stérols colorimétriquement sur une partie aliquote.

TABLEAU E-F
Comparaison des techniques de Windaus-Grosskopf
et au sulfate de sodium anhydre.

Expériences	Solvants	Stérols totaux	Total des stérols extraits	Techniques
<i>E</i> (Windaus)	alcool sodé éther	22,6	22,6	LIEBERMANN.
<i>E'</i> (Windaus)	alcool sodé éther	23	23	LIEBERMANN.
<i>F</i> (SO^4Na^2)	acétone	18	39	LIEBERMANN.
	chloroforme	3		
	alcool alcool sodé	6,2 12		
<i>F''</i> (SO^4Na^2)	acétone	18	46	LIEBERMANN.
	chloroforme	2,2		
	alcool	10		
	alcool sodé	16		

(Stérols exprimés en milligrammes d'ergostérol pour 20 gr. de levure fraîche pressée.)

En ce qui concerne la richesse en stérols des différents extraits obtenus, ces chiffres nous démontrent que :

1° Notre méthode semble la meilleure ;

2° Deux expériences parallèles n'ont pas donné de chiffres comparables, et on peut se demander comme dans le chapitre précédent si cela tient à une différence dans le tassement de la poudre pendant l'extraction, ou bien à une différence dans la prise du sulfate de sodium.

La levure employée contenait, cette fois, 30 % de matières sèches et, si nous prenons le chiffre maximum des expériences E et F, nous trouvons 46 mgr. de stérols pour 20 gr. de levure fraîche, soit 7 gr. 7 par kilogramme de levure sèche.

D. — Hypothèse sur l'état des cellules de levure pendant l'extraction. La levure diluée avec la terre d'infusoires donne une extraction supérieure à celle au sulfate de sodium. Courbes d'extraction.

Nos essais sur la plasmolyse, exposés dans le chapitre suivant, nous ont fait employer la terre d'infusoires comme desséchant. La terre d'infusoires est une poudre incomparablement plus ténue que le sable le plus fin et nous avons pensé que si nous faisons deux expériences parallèles, l'une avec de la levure diluée dans un grand volume de terre à infusoires et l'autre avec notre technique au sulfate de sodium, nous éclaircirions complètement l'une des hypothèses concernant l'action du sulfate de sodium anhydre. En effet, l'action de ce sel ne peut s'expliquer que par une des trois hypothèses suivantes :

- 1° simple dilution mécanique ;
- 2° écrasement des cellules ;
- 3° plasmolyse provoquée par la forte concentration en sel.

Nous avons déjà examiné la première hypothèse lorsque nous avons fait nos expériences comparatives avec de la levure au sulfate de sodium et de la levure au sable. Les résultats obtenus nous avaient fait conclure au rejet de cette hypothèse, mais l'on pouvait objecter que les grains de sable certainement très petits (tous devaient passer entre les mailles d'un tamis n° 50) étaient encore plus gros que les particules de sulfate de sodium. Cette fois c'est la poussière qui constitue la terre d'infusoires qui sera plus ténue que le sulfaté de sodium pulvérisé.

Nous avons aussi remarqué précédemment que deux expériences poursuivies parallèlement suivant notre technique donnaient des résultats trop différents les uns des autres pour pouvoir être imputables à la technique d'extraction ou à la méthode de dosage. Et nous avons admis que malgré un temps d'extraction assez long (8 h.) un certain tassement empêchait la pénétration de toute la masse par les solvants. Aussi dans les deux expériences parallèles ci-dessous, nous avons suivi l'extraction d'heure en heure en changeant notre solvant toutes les heures. Et toutes les deux heures seulement la poudre était extraite, séchée, répulvérisée, rétamisée

et réintroduite dans l'allonge. Nous aurons ainsi l'influence du broyage au cours de l'épuisement.

EXPÉRIENCE.

α) Préparation des poudres à extraire.

1^o Nous avons traité 20 gr. de levure SPRINGER fraîche pressée suivant notre technique au sulfate de sodium anhydre (50 gr. de sel).

2^o Nous avons trituré la même quantité avec 20 gr. de terre d'infusoires. Nous avons au préalable convenablement dégraissé et lavé la terre d'infusoires employée, par ébullition dans l'acétone bouillant; nous avons séparé l'acétone par décantation, puis nous avons traité de même la terre par le chloroforme et l'alcool à 90° et nous l'avons enfin calcinée au rouge sombre.

Les deux poudres sont portées dans le vide sur anhydride phosphorique, vide de 6 mm. Après 24 heures les poudres sont passées au tamis n° 80 et reportées dans le vide pendant 24 heures. Nous tassons alors chacune de ces poudres dans l'allonge d'un appareil de M. FRANÇOIS, lequel est placé au-dessus d'un ballon rond de 200 cm³.

β) Epuisement.

Etudions maintenant l'action de chacun des solvants employés successivement : acétone, chloroforme, alcool et alcool sodé.

I. — ACÉTONE.

Nous introduisons dans chacun des ballons 100 cm³ d'acétone pur exempt d'eau et chauffons au B.-M. bouillant. Nous réglons l'ébullition de façon à obtenir un épuisement par écoulement du liquide à la vitesse de I goutte à I goutte 1/2 par seconde. Nous retirons l'acétone après une heure, elle constituera l'acétone I. Nous la remplaçons par 100 cm³ de nouvelle acétone que nous retirons aussi après une heure d'épuisement et qui constituera l'acétone II. Cette seconde heure écoulée, nous retirons la poudre de l'appareil et la séchons à l'air libre puis dans le vide sur anhydride phosphorique. Nous la pulvérisons au mortier, la passons au tamis n° 80 et recommençons une nouvelle extraction avec 100 cm³ de nouvelle acétone (acétone III) que nous remplaçons après une heure d'épuisement. Pendant 8 heures nous changeons de solvant

toutes les heures et séchons et pulvérisons la poudre toutes les deux heures seulement.

Chaque extrait acétonique est évaporé au B.-M. puis séché dans le vide sur anhydride phosphorique et pesé. Nous obtenons ainsi les extraits I pour la première heure, II pour la deuxième heure, etc., etc., etc...

Ces extraits sont repris par 20 cm³ de chloroforme bouillant, et le dosage des stérols totaux effectué par la méthode colorimétrique habituelle sur une partie aliquote ; de même le phosphore est dosé, après minéralisation, par la méthode de COPAUX.

Les chiffres obtenus sont résumés dans le tableau suivant, chiffres en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche pressée :

I. — EXTRACTION ACÉTONIQUE.

	Levure +	Extraits	Stérols	Phosphore
1 ^{re} heure ...	I SO ⁴ Na ²	132	40	néant
	I terre	291	117	néant
2 ^e heure.....	II SO ⁴ Na ²	10	1	néant
	II terre	34	1,8	néant
Trituration.				
3 ^e heure.....	III SO ⁴ Na ²	30	5,5	traces
	III terre	64	5,3	0,3
4 ^e heure.....	IV SO ⁴ Na ²	5	0,5	néant
	IV terre	9	0,5	néant
Trituration.				
5 ^e heure.....	V SO ⁴ Na ²	55	8	traces
	V terre	64	2,6	0,2
6 ^e heure.....	VI SO ⁴ Na ²	10	0,4	néant
	VI terre	11	traces	néant
Trituration.				
7 ^e heure.....	VII SO ⁴ Na ²	15	0,7	néant
	VII terre	10	1,6	néant
8 ^e heure.....	VIII SO ⁴ Na ²	7	traces	néant
	VIII terre	10	traces	néant

Total des extraits acétoniques :

avec la levure au sulfate de sodium 264 milligr.
avec la levure à la terre d'infusoires 493 —

Total des stérols des extraits acétoniques :

avec la levure au sulfate de sodium 56 milligr.
avec la levure à la terre d'infusoires 128,8 —

(Chiffres en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche pressée ; stérols exprimés en ergostérol.)

Ces premiers résultats permettent d'observer :

1° L'influence certaine de la trituration qui tendrait à prouver qu'une lixiviation de 8 heures serait loin de retirer tous les stérols puisqu'il a fallu ce temps et trois triturations (plus l'initiale) pour sortir tous les stérols solubles dans l'acétone.

2° Que la majeure partie de l'action du sulfate de sodium (pour ne pas dire la totalité) est une action mécanique due à la dilution qu'il provoque.

3° Que l'acétone ne retire que des traces absolument infimes de phosphore.

II. — CHLOROFORME.

Comme nous avons cette fois deux poudres contenant certainement moins de 1 mgr. d'ergostérol entraînable par l'acétone, nous avons fait agir le chloroforme pour voir s'il avait une réelle action, quoique celle-ci soit très faible comme nous l'avions déjà constaté.

Après la 8^e heure la poudre est donc séchée, pulvérisée, tamisée, et nous recommençons comme pour l'extraction à l'acétone.

Les chiffres suivants permettent d'affirmer que l'action n'est pas nulle, mais complètement négligeable pour une technique d'extraction des stérols.

II. — EXTRACTION CHLOROFORMIQUE.

	Levure +	Extraits	Stérols	Phosphore
9 ^e heure ..	I SO^4Na^2	14	1,2	0,01
	I terre	18	2	0,01
10 ^e heure ..	II SO^4Na^2	4	traces	néant
	II terre	4	traces	néant

(Chiffres en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche pressée déjà épuisée à l'acétone.)

III. — ALCOOL.

Après 10 heures d'extraction la poudre est séchée, pulvérisée, tamisée et nous recommençons avec de l'alcool à 90° ce que nous avons déjà fait avec l'acétone. Mais cette fois les extraits sont

déduits d'une partie aliquote, le reste de l'alcool évaporé au demi environ est additionné de son volume d'eau et épuisé deux fois par 30 cm³ d'éther. L'éther évaporé, le résidu est repris par 20 cm³ de chloroforme et le dosage colorimétrique opéré au LIEBERMANN sur une partie aliquote (5 cm³ en général).

Il nous a été cette fois très difficile d'obtenir une lixiviation régulière goutte à goutte. Aussi les extraits fournissent-ils parfois des chiffres aberrants résumés dans le tableau III.

Il est toutefois notable que par l'extraction alcoolique, la trituration a une moins grande importance.

III. — EXTRACTION ALCOOLIQUE.

	Levure +	Extraits	Stérols
11 ^e heure.....	I SO ⁴ Na ²	54	2
	I terre	57	2
12 ^e heure	II SO ⁴ Na ²	48	2,5
	II terre	142	2
Trituration.			
13 ^e heure	III SO ⁴ Na ²	30	4
	III terre	42	3
14 ^e heure	IV SO ⁴ Na ²	2	traces
	IV terre	4	traces
Trituration.			
15 ^e heure.....	V SO ⁴ Na ²	15	2,5
	V terre	7	0,3
16 ^e heure.....	VI SO ⁴ Na ²	1	traces
	VI terre	1	traces
Trituration.			
17 ^e heure.....	VII SO ⁴ Na ²	10	2
	VII terre	4	0,6
18 ^e heure.....	VIII SO ⁴ Na ²	traces	néant
	VIII terre	traces	néant

Total des extraits alcooliques :

avec la levure au sulfate de sodium	160	milligr.
avec la terre d'infusoires.....	257	—

Total des stérols contenus dans les extraits alcooliques :

avec la levure au sulfate de sodium	13	—
avec la terre d'infusoires.....	7,9	—

(Chiffres en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche pressée déjà, épuisée par l'acétone et par le chloroforme, stérols exprimés en ergostérol.)

IV. — ALCOOL SODÉ.

Après l'action de l'alcool nous avons essayé en dernière analyse l'action de l'alcool sodé. Pour cela les poudres précédentes ont été séchées dans le vide sur anhydride phosphorique, pulvérisées et tamisées, puis introduites dans des ballons ronds de 250 cm³ avec 100 cm³ d'alcool à 90° et 10 cm³ de solution de soude Codex. Le tout est porté 3 heures au B.-M. bouillant puis le produit est essoré à la trompe et reporté de nouveau au B.-M. une heure avec 100 cm³ d'alcool. Les liquides alcooliques sont réunis, évaporés de moitié, additionnés de leurs volumes d'eau et extraits complètement en trois fois avec 100 cm³ d'éther. L'éther est ensuite lavé avec de l'eau très légèrement chlorhydrique (1 %) et évaporé. Le résidu repris par 20 cm³ fait l'objet d'un dosage colorimétrique des stérols qui donne :

IV. — EXTRACTION SODO-ALCOOLIQUE.

Levure + SO^4Na^2	12 mgr. 5 stérols totaux
Levure + terre	2 mgr. 5 —

(Stérols exprimés en ergostérol pour 20 gr. de levure fraîche épuisée par l'acétone, le chloroforme et l'alcool.)

CONCLUSIONS.

Si nous réunissons en un tableau les chiffres exprimant les stérols nous obtenons :

TABLEAU G

Solvants	Stérols totaux		Technique
	Levure + terre	Levure + SO^4Na^2 anh.	
Acétone.....	128,8	56	LIEBERMANN.
Chloroforme	2	1,2	—
Alcool à 90°	17,9	13	—
Alcool sodé	2,5	12,5	—
Total.....	141,2	82,7	—

(Stérols exprimés en milligrammes d'ergostérol pour 20 gr. de levure fraîche pressée.)

Pour cette expérience : 20 gr. de levure fraîche = 6 gr. 6 de levure sèche.

Pour la technique au sulfate de sodium cette extraction est la plus forte de celle que nous ayons obtenu. Le calcul donne en effet 12 gr. 5 de stérols totaux, exprimés en ergostérol, par kilogramme de levure sèche.

Nous pensons que cela tient à l'influence de la pulvérisation qui a renouvelé les surfaces de contact.

Ce chiffre de 12 gr. 5 est largement dépassé par celui donné par la terre d'infusoires qui nous donne 20 gr. 4 de stérols totaux par kilogramme de levure sèche. Et nous pensons que l'action du sulfate de sodium anhydre est uniquement une action mécanique : il agit en séparant les agglomérats de cellules.

NOTA. — Il est toujours entendu que ces chiffres ne correspondent à rien en valeur absolue, et ne peuvent être opposés qu'aux chiffres obtenus par la même méthode de dosage. Ainsi nous pensons pouvoir les comparer à ceux de HEIDUSCHKA qui obtient au maximum 11 gr. 7 de stérols par kilogramme de levure sèche.

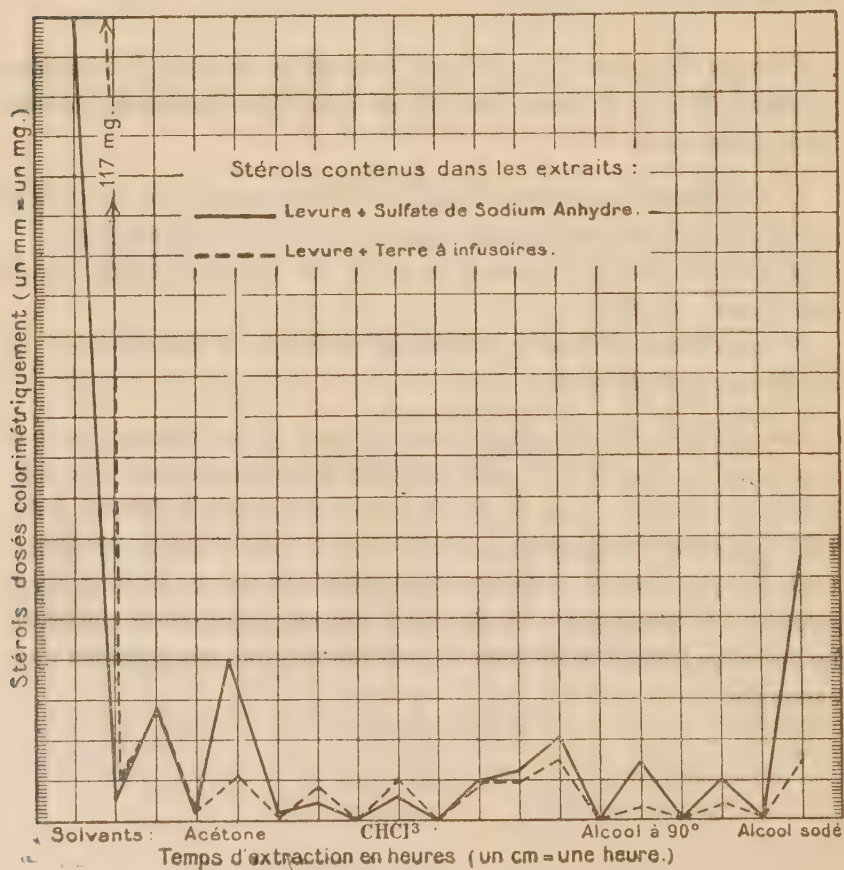
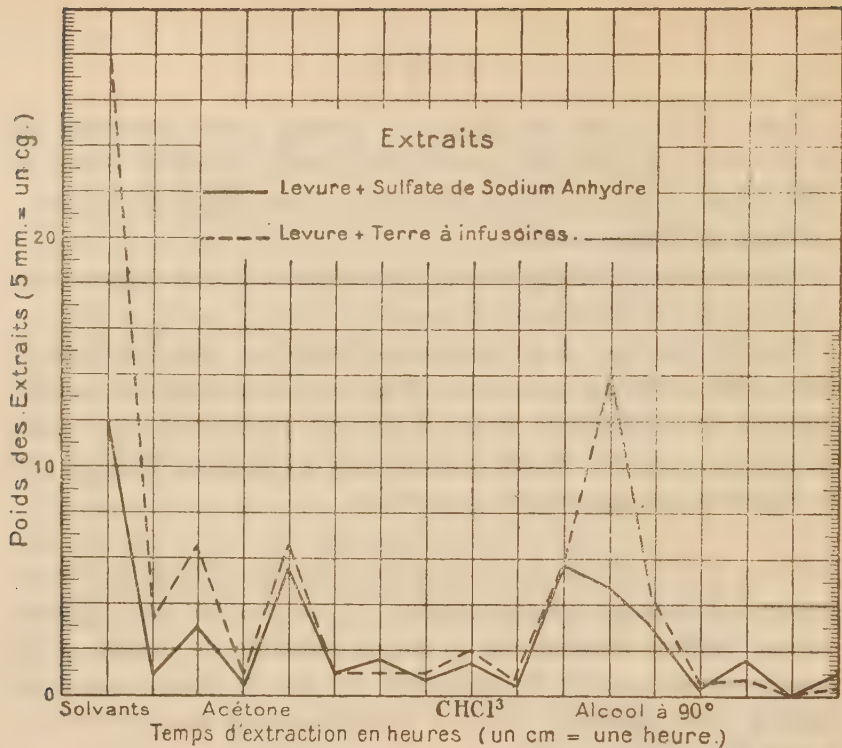
Courbes d'extraction. — Si nous traçons les courbes d'extraction donnant d'heure en heure les extraits totaux ou les stérols obtenus nous constatons :

1° L'influence nette du broyage de la poudre pour une extraction acétonique, et encore sensible pour une extraction alcoolique.

2° La non proportionnalité du poids des extraits et des stérols qui y sont contenus.

3° L'extrême difficulté qu'ont les solvants à enlever tout ce qu'ils peuvent dissoudre.

Les courbes des stérols peuvent à un premier examen ne pas être satisfaisantes pour l'esprit, car elles se terminent par des segments ascendants. Mais la technique d'extraction à l'alcool sodé, telle que nous l'employons suivant WINDAUS et GROSSKOPF, retire tout ce que l'alcool sodé est susceptible d'enlever, comme nous avons pu le remarquer ; et, il nous a semblé inutile de remettre la levure avec l'alcool sodé pour le seul fait d'avoir une branche descendante.



E. — Inutilité de la plasmolyse préalable.

Nous avons cherché si la plasmolyse pouvait nous procurer plus de stérols que ne le faisaient les procédés mécaniques employés jusqu'alors.

La plasmolyse provoque en effet d'importantes transformations cytoplasmiques et on peut s'en faire une idée schématique par l'explication qu'en donnent A. GUILLIERMOND, G. MANGENOT et L. PLANTEFOL dans leur *Traité de cytologie végétale* (38).

« Dans la première phase, il se produit une exosmose rapide déterminant la contraction de la vacuole et celle du cytoplasme, ainsi qu'une augmentation de ses courants.

Dans la seconde phase, il y a production de figures pseudomyéliniques et alvéolisation du cytoplasme qui semblent dues à la séparation de son eau de constitution qui s'emmagasine dans de petites vacuoles avant de se diffuser vers l'extérieur.

« Dans une troisième phase, la déshydratation atteint son maximum et la mort survient. Alors se produit une nouvelle hydratation du cytoplasme devenu perméable par suite de la désorganisation de la pellicule ectoplasmique, hydratation amenant la vésiculisation des chondriosomes et des plastes. La vacuole, plus résistante, finit par se résorber par désorganisation de sa paroi, puis le cytoplasme et le noyau se coagulent. »

Si les stérols se trouvent en grande partie dans le cytoplasme, il n'est pas douteux que la plasmolyse ait sur eux une action intéressante par la désorganisation plus ou moins totale du cytoplasme. Si les stérols sont localisés dans la membrane, on pouvait penser que la plasmolyse augmente la perméabilité de celle-ci aux solvants, et c'était à tout le moins une expérience à tenter.

Nous avons pour cela traité la même levure par les trois techniques suivantes :

1^o Nous avons mélangé 20 gr. de levure avec son poids de terre à infusoires, c'est la levure de l'expérience précédente.

2^o Dans un ballon à long col, nous avons agité 20 gr. de levure et 10 cm³ de chloroforme que nous avons laissé une heure en contact. Nous avons ensuite trituré le mélange avec 20 gr. de terre à infu-

soires et nous avons laissé la poudre perdre son chloroforme à l'air libre.

3° Nous avons mélangé au mortier 20 gr. de levure et 20 gr. de saccharose en poudre. Le mélange est devenu presque instantanément visqueux et après 5 minutes seulement (pour éviter la fermentation) nous l'avons trituré avec 20 gr. de terre à infusoires.

Ces trois poudres sont portées simultanément dans le vide profond (6 mm.) sur anhydride phosphorique. Après 24 heures nous les avons passées au tamis n° 80 et reportées dans le vide 24 heures ; nous les avons alors triturées avec une spatule et reportées une dernière fois dans le vide pendant 48 heures. Nous avons laissé aussi longtemps dans le vide parce que la levure plasmolysée au saccharose cède très difficilement son eau en formant une pâte visqueuse.

La levure I (terre) est épuisée à l'acétone puis à l'alcool comme nous l'avons indiqué au chapitre précédent.

Les levures II et III sont épuisées simultanément 2 heures dans un appareil de KUMAGAWA par 100 cm³ d'acétone, puis les poudres sont retirées de la cartouche, séchées, pulvérisées, tamisées et épuisées de nouveau 4 heures par 100 cm³ d'acétone.

Enfin pour plus de sûreté les poudres sont agitées 15 minutes avec 100 cm³ d'acétone bouillant dans un ballon à long col.

Les levures II et III sont épuisées ensuite 6 heures par 150 cm³ d'alcool à 90° dans l'appareil de KUMAGAWA. Les courbes du chapitre précédent nous ayant montré que l'influence de la trituration est beaucoup moindre dans l'épuisement à l'alcool, nous avons épuisé en une seule fois.

Le poids des extraits acétoniques a été pris comme d'habitude : évaporation au B.-M., vide sur anhydride phosphorique. Les stérols acétoniques ont été dosés colorimétriquement par la réaction de LIEBERMANN et comparaison avec une solution d'ergostérol, après reprise de l'extrait par le chloroforme bouillant.

Les liquides alcooliques réduits au demi, ont été épuisés suivant la technique habituelle, par l'éther, éther lavé à l'eau et séché au sulfate de sodium anhydre. Les extraits étherés évaporés sont repris par du chloroforme et le dosage fait sur une partie aliquote.

Les chiffres obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

TABLEAU H

	Levure +		
	Terre	Chloroforme terre	Saccharose terre
Total des extraits acétoniques ...	483	313	1.155
Total des stérols acétoniques	129	57	57
Total des stérols alcooliques	8	18	20
Total des stérols extraits	137	75	77

(Chiffres en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche pressée.)

Nous voyons ainsi que non seulement la plasmolyse ne donne pas une extraction en stérols supérieure aux techniques précédentes, mais encore que tout se passe comme si les levures accompagnées de leurs lysats se colmataient avec la terre à infusoires pour donner une extraction en stérols tout au plus égale à la levure au sulfate de sodium.

**F. — Données en vue de l'établissement
d'une technique d'extraction simplifiée : division et broyage.**

Nous pensons posséder maintenant une technique qui enlève tous les stérols contenus dans la levure de bière. C'est celle du paragraphe D utilisant la terre d'infusoires, la trituration et 4 solvants successifs.

Cherchons à la simplifier, à la rendre pratique : nous constatons d'abord que l'acétone enlève 128 mgr. 8 de stérol pour 20 gr. de levure fraîche, tandis que le chloroforme, l'alcool et l'alcool sodé réunis n'enlèvent que 12 mgr. 4. De plus, si nous supprimons les 3 dernières heures d'extraction acétonique, nous ne perdons que 1 mgr. 6 environ.

Nous pouvons aussi gagner du temps en supprimant la 2^e et la 4^e heure dont les produits d'extraction se retrouvent pour la presque totalité à la 3^e et à la 5^e heure. Et alors avec une perte par défaut d'un peu plus de 10 % nous arrivons à la technique d'extraction très simple suivante :

a) Triturer la levure de bière fraîche pressée avec son poids de terre d'infusoires lavée et calcinée.

b) Porter cette poudre 24 heures en couche mince dans le vide profond (10 mm. au moins) sur anhydride phosphorique.

c) Tamiser au tamis fin (n° 100 au moins) et reporter 24 heures dans le vide.

d) Extraire une heure par l'acétone bouillant dans un appareil à épuisement, retirer la poudre, la sécher à l'air, la retriturer, et l'épuiser à nouveau une heure. Recommencer cette opération une autre fois encore. Soit en tout trois heures d'extraction.

e) Evaporer les extraits acétoniques. Les reprendre par l'alcool méthylique bouillant (qui permet une meilleure cristallisation que l'alcool ordinaire) et faire cristalliser à froid.

f) Purifier le produit par cristallisations successives.

Nous avons voulu nous assurer que cette technique ne pouvait être mise en parallèle avec d'autres. Pour cela nous avons établi un protocole de trois expériences :

1^o Dans une expérience nommée W., nous épuisons la levure suivant WINDAUS, mais, puisque nous cherchons une extraction pratique, nous négligeons l'épuisement de la levure à l'éther.

2^o Dans une expérience nommée T. W. nous traitons la levure suivant notre technique jusqu'à *d* exclus, et à partir de là, nous extrayons à l'alcool sodé suivant WINDAUS, toujours en négligeant l'extraction éthérée.

3^o Dans une dernière expérience nommée T. A. nous suivons point par point notre technique simplifiée de la page précédente.

EXPÉRIENCE W.

Nous ne donnerons ici que les caractéristiques spéciales de l'expérience (voir plus haut la description de la technique complète de WINDAUS : paragraphe C).

Prise d'essai : levure Springer pressée	250 gr.
Ether ayant servi à épuiser les liquides alcooliques.....	1 litre
Lavage de cet éther par de l'eau chlorhydrique à 1 %.	
Stérols totaux contenus dans l'éther (par dosage colorimétrique sur une partie aliquote)	250 mgr.

Les extraits éthérés, évaporés, ont laissé une sorte de résidu mielleux d'aspect légèrement cristallin. Cet extrait a été repris par 20 cm³ d'alcool méthylique bouillant dans lequel il est entièrement soluble. Le liquide porté au mélange réfrigérant (glace + sel) a laissé déposer un précipité floconneux, cristallin, que nous avons recueilli, essoré à la trompe et lavé avec de l'alcool méthylique froid.

Ce précipité cristallin a présenté les caractéristiques suivantes :

Poids	292 mgr.
Poids du complexe digitonosite-stérols.....	284 mgr.
Stérols déduits du complexe précédent	66 mgr.
— estimés par la réaction de Liebermann	70 mgr.

Le précipité dissout dans 20 cm³ de chloroforme a donné une déviation de

$$\rho = - 1^{\circ} 10'$$

Ce qui donne comme pouvoir rotatoire du précipité

$$(\alpha)_D = - 40^{\circ}$$

EXPÉRIENCE T. W.

Prise d'essai :

Levure Springer pressée	210 gr.
Terre d'infusoires purifiée.....	210 gr.

La poudre séchée et tamisée (il est impossible de tamiser avant dessiccation) ne pèse plus que 270 gr., soit : levure 60 gr. et terre 210 gr. Pour cette expérience T. W. nous prenons 200 gr. du mélange (le reste servira à l'expérience T.), ce qui correspond à 155 gr. 4 de levure fraîche pressée et 44 gr. 4 de levure sèche.

Nous sommes cette fois obligé de prendre plus d'alcool que ne l'indique WINDAUS pour pallier à l'absorption par la terre ; les deux fois nous traitons par 800 cm³ d'alcool à 90° et 40 cm³ de lessive de soude Codex.

Les liquides alcooliques sont épuisés par 950 cm³ d'éther, lequel est ensuite lavé avec 200 cm³ d'eau chlorhydrique à 1 %.

L'éther desséché contient : 506 mgr. de stérols exprimés en ergostérol par le dosage colorimétrique habituel.

Une partie de l'alcool ayant formé une émulsion au cours de l'extraction étherée, nous avons cherché combien il avait pu retenir de stérols et nous avons trouvé 19 mgr., ce qui donne comme chiffre total de stérols extraits : 525 mgr.

Nous avons poursuivi ensuite l'extraction et la purification du produit par l'alcool méthylique comme dans l'expérience W précédente.

Le précipité cristallin a présenté les caractéristiques suivantes :

Poids	540 mgr.
Poids du complexe digitonosite-stérols	1.132 mgr.
Stérols déduits du complexe précédent	283 mgr.
Stérols dosés par la réaction de Liebermann	143 mgr.

Le précipité dissout dans 20 cm³ de chloroforme a donné une déviation de

$$\rho = - 2^{\circ} 30'.$$

Ce qui donne comme pouvoir rotatoire du précipité

$$(\alpha)_D = - 46^{\circ}$$

EXPÉRIENCE T. A.

Prise d'essai : 60 gr. de levure séchée de l'expérience T. W. Ce qui fait environ 46 gr. 6 de levure fraîche ou 13 gr. 3 de levure sèche.

L'expérience a été conduite comme il est indiqué au début de ce paragraphe.

L'acétone contenait : 177 mgr. de stérols exprimés en ergostérol et dosés colorimétriquement.

Le précipité cristallin présentait les caractéristiques suivantes :

Poids	312 mgr.
Poids du complexe digitonoside-stérols	428 mgr.
Stérols déduits du complexe précédent.....	107 mgr.
Stérols dosés par la réaction de Liebermann	91 mgr.

Le précipité dissout dans 20 cm³ de chloroforme a donné une déviation de

$$\rho = -0^{\circ} 56'$$

Ce qui donne comme pouvoir rotatoire du précipité

$$(\alpha)_D -30^{\circ}.$$

Dans ces trois expériences nous avons pris les caractéristiques du magma cristallin le jour même de son isolement.

Malgré cela une altération certaine s'est produite dans l'intervalle des différentes déterminations. En effet, comme nous l'avons dit dans le chapitre I, l'ergostérol et surtout le zymostérol s'altèrent très rapidement à l'air et à la lumière.

CONCLUSIONS.

Si nous rapportons tous ces chiffres à 100 gr. de levure fraîche pressée, nous aurons le tableau suivant qui nous permet de constater :

1^o La supériorité de l'extraction sodo-alcoolique sur la levure desséchée (expérience T. W. ou TERRE-WINDAUS) par rapport à la même extraction sur la levure fraîche (expérience W. ou WINDAUS).

2^o L'incontestable supériorité de l'extraction acétonique par lixiviation (expérience T. A. ou TERRE-Acétone) sur l'extraction sodo-alcoolique par agitation (expérience W. et T.W.).

TABLEAU COMPARATIF DES RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES TROIS
TECHNIQUES D'EXTRACTIONS SIMPLIFIÉES.

	Windaus W.	Terre Windaus T. W.	Terre Acétone T. A.
Stérols totaux dosés colorimétriquement contenus dans le liquide extractif	3,50	11,82	13,30
Poids du magma cristallin après une reprise par l'alcool méthylique	4,09	12,16	23,45
Stérols contenus dans le précipité cristallin (dosés colorimétriquement)	0,09	3,22	6,84
Poids du précipité digitonosidique que donnerait tout le précipité cristallin ..	3,69	25,52	32,18
Ergostérol-zymostérol déduits du précipité digitonosidique	0,92	6,38	8,04

(Chiffres en grammes rapportés à 1 kilogramme de levure sèche.)

100 gr. de levure fraîche correspondent à 28 gr. 57 de matières sèches.

Nous avons calculé aussi le pouvoir rotatoire des précipités cristallins ; et, à titre simplement indicatif, sans que ces chiffres puissent signifier quelque chose en valeur absolue, nous avons calculé le pouvoir rotatoire de la partie stérolique de ce précipité cristallin. Nous avons admis, ce qui est vraisemblable, qu'elle seule agit sur la lumière polarisée, et nous avons pris comme grandeur tantôt le chiffre donné par la méthode digitonosidique, tantôt celui donné par la méthode colorimétrique.

Le tableau suivant nous permet de constater que l'extraction T. fournit des chiffres plus faibles, ce qui tendrait à prouver que l'extraction à l'acétone altère moins les stérols : les pouvoirs rotatoires plus faibles provenant d'une plus grande quantité de stérol droit dans la masse stérolique.

POUVOIRS ROTATOIRES.

	Expériences		
	Windaus W.	Terre-Windaus T. W.	Terre-acétone T. A.
1° Du précipité cristallin	— 40°	— 46°	— 30°
2° Des stérols de ce précipité :			
a) le poids des stérols étant déduit du précipité digitonosidique	— 176°	— 88°	— 87°
b) le poids des stérols étant déduit du dosage colorimétrique.	— 166°	— 174°	— 102°

En conclusion, la méthode simplifiée décrite au début de ce paragraphe F est loin d'atteindre la puissance de celle indiquée au paragraphe D, mais elle est encore très supérieure aux autres et grâce à sa rapidité permet d'obtenir rapidement un excellent rendement en stérols.

CHAPITRE IV

Recherches sur la distribution des stérols et des lécithides dans la cellule de levure.

PARTIE THÉORIQUE

Ce chapitre contient quelques expériences nouvelles et surtout le résumé des travaux des deux chapitres précédents.

En ce qui concerne la distribution des stérols dans la levure, nous avons cherché succinctement comment ils se trouvaient répartis entre les trois éléments principaux des cellules : cytoplasme, noyau, membrane. Nous avons déjà vu (chap. III, § E) que malgré les transformations cytoplasmiques déclanchées par la plasmolyse, l'extraction en stérols par nos solvants n'avait pas été améliorée. Nous avons cherché ici si le liquide d'exosmose contenait des quantités intéressantes de stérols, et il n'en est rien. Aussi, si nous considérons l'extrême particularité des stérinoplastes de MIRANDE, nous sommes amené à penser que pour la levure *tout se passe comme si les stérols étaient localisés pour leur presque totalité dans la membrane cellulaire.*

En dosant les lécithides et les stérols nous avons recherché une preuve à l'appui de l'existence probable d'une combinaison stérols-lécithides ; nous avons recherché aussi si stérols et lécithides n'étaient pas combinés dans des proportions définies, puisque HEIDUSCHKA (40) avait déjà constaté « un abaissement de la teneur de la levure en ergostérol en ajoutant des phosphates qui diminuent le pourcentage de graisse ».

Il y a quelques années, des recherches sur l'existence d'un groupement protéides, lécithides, stérols dans le sang, ont été entreprises par M. MACHEBŒUF (66) qui écrivait alors :

« Dans la substance ici extraite du sérum et du plasma, l'albumine, les phospholipides et les stérols ne sont pas à l'état de liberté

mais unis par des liaisons physiques ou chimiques, liaisons assez fortes pour modifier complètement les propriétés physiques des divers constituants, pas assez puissantes cependant pour résister à l'action d'agent énergiques (tels que l'alcool bouillant) qui peuvent séparer les constituants. »

Et en effet nous avons vu que l'alcool bouillant entraînait des stérols là où l'acétone et le chloroforme n'avaient plus d'action. Ce fut le point de départ de nos recherches sur l'entraînement en lécithides et en stérols de quatre solvants successifs : acétone, chloroforme, alcool, alcool sodé. L'acétone dissout les stérols et laisse lécithides et protéides, le chloroforme dissout stérols et lécithides et est sans action sur les protéides, l'alcool coagule les protéides et dissout les deux autres corps, enfin l'alcool sodé saponifie.

Il faut, dès l'abord, distinguer entre la levure fraîche et la levure sèche.

En ce qui concerne la levure fraîche tout se passe comme si la presque totalité des stérols était à l'état combiné. En effet l'acétone, excellent solvant des stérols, n'enlève presque rien à la levure fraîche, le chloroforme agissant ensuite n'entraîne aussi que de petites quantités de stérols et l'alcool et surtout l'alcool sodé presque tout.

En ce qui concerne la levure sèche, nous constatons que vis-à-vis des solvants il y a pendant la dessiccation comme une séparation des constituants des diverses combinaisons stéroliques.

Car l'acétone à partir de la levure convenablement divisée entraîne cette fois des quantités massives de stérols et toujours des traces infimes de phosphore. Ce qui nous fait penser qu'une grande partie des stérols se trouve dans la cellule sèche à l'état libre ou simplement estérifiée.

Puis, par des dosages et des extractions successives nous nous sommes assuré que l'acétone n'enlevait plus trace de stérols dans le produit examiné, et nous avons fait agir le chloroforme. Dans tous les cas le chloroforme a enlevé une certaine quantité de stérols, quantité très petite il est vrai, mais néanmoins certainement existante, et si l'on considère l'action dissolvante spéciale du chloroforme, on peut penser avec quelque vraisemblance que les stérols enlevés par le chloroforme après l'action de l'acétone sont

inclus dans une combinaison transitoire, telle que stérols-lécithides.

Enfin après avoir fait agir les solvants précédents, nous avons utilisé l'alcool. Ce solvant provoque une nouvelle sortie assez importante de stérols, et concurremment une grande quantité de lécithides passent dans l'extrait.

De tout cela nous croyons pouvoir conclure que dans la levure fraîche tout se passe vis-à-vis des solvants comme si presque tous les stérols, les lécithides étaient engagés dans des complexes : stérols-protéides-lécithides. Pendant la dessiccation il y a comme un clivage de ces combinaisons et une petite partie des stérols seulement et la majorité des lécithides restent engagés dans ces complexes.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PLAN : A. — Données de la plasmolyse.

B. — Action de l'acétone. Conséquences.

C. — Faiblesse d'action du chloroforme après l'acétone.

D. — Pénétration alcoolique.

A. — Données de la plasmolyse.

Plusieurs moyens de plasmolyser les cellules s'offraient à nous : le chloroforme, le saccharose en poudre, etc.

Nous avons essayé le premier en abandonnant pendant une heure 20 gr. de levure avec 10 cm³ de chloroforme, puis en portant au B.-M. après avoir ajouté 100 cm³ de chloroforme. L'extraction stérolique fut pratiquement nulle (moins d'un milligramme). La levure traitée ensuite par l'alcool n'abandonne qu'une quantité de stérols (11 mgr.) égale à celle fournie par une levure non chloroformée.

Le saccharose en poudre nous avait tout d'abord donné de grands espoirs. En effet deux lots de levure traités suivant la technique de WINDAUS avaient fourni respectivement 125 et 120 mgr. de stérols (dosage colorimétrique), tandis que deux autres lots identiques plasmolysés un quart d'heure avec une égale quantité de saccharose avaient donné 150 et 190 mgr. de stérols. Mais nous avons reconnu par la suite que le sucre avait seulement agi comme diluant à la manière du sable (chap. III, § E).

Si les stérols étaient localisés dans le cytoplasme, il est probable que le processus auquel celui-ci a été soumis aurait entraîné une solubilisation ultérieure dans les solvants employés ; nous avons assisté en effet à une déshydratation du cytoplasme par exosmose, à une réhydratation après la mort de la cellule (GUILLERMOND) (38) et à une nouvelle déshydratation par dessiccation de la cellule. C'est ce qui nous donne à penser que les stérols sont surtout localisés dans la membrane.

Nous avons cherché à titre documentaire si le liquide d'exosmose que nous appelons ici lysat contenait une certaine quantité de stérols et sous quelles formes ?

Nous triturons donc 100 gr. de levure fraîche et 100 gr. de sucre cristallisé du commerce. Après repos de la masse pendant quinze minutes nous la diluons dans 100 cm³ d'eau distillée et la centrifugeons à grande vitesse. Nous décantons le liquide qui constitue ce que nous nommerons le 1^{er} lysat. Nous diluons la partie solide avec 100 cm³ d'eau, nous centrifugeons et nous obtenons ainsi un 2^e lysat et de même un 3^e lysat et un résidu de cellules lavées.

α) *Épuisement à l'éther des lysats ou recherche des stérols libres* : Nous épuisons ces lysats par deux fois 100 cm³ d'éther que nous évaporons au B.-M., nous desséchons l'extrait dans le vide (8 mm.) sur chlorure de calcium pendant 12 heures. Nous reprenons les extraits par du chloroforme et nous y dosons les stérols colorimétriquement. Nous obtenons :

	Extraits	Stérols
Lysat I	13	1
Lysats II et III	26	(1)

(Chiffres en milligrammes pour 100 gr. de levure fraîche pressée.)

β) *Extraction à l'alcool sodé ou stérols combinés* : Nous traitons de nouveau les lysats une heure au B.-M. par 20 cm³ de lessive de soude Codex et 100 cm³ d'alcool à 90°. Après addition d'eau les liqueurs sont épuisées par l'éther, et nous continuons comme dans le paragraphe α. Nous obtenons :

	Extraits	Stérols
Lysat I	230	10
Lysats II et III	83	3

(Chiffres en milligrammes pour 100 grammes de levure fraîche pressée.)

Le résidu cellulaire traité par l'acétone puis par la méthode de WINDAUS nous a fourni plus de 200 mgr. de stérols totaux.

Il ressort de ces chiffres que le liquide d'exosmose provenant de la contraction du cytoplasme par la plasmolyse, ne contient que de petites quantités de stérols et ces stérols sont à l'état combiné.

B. — Action de l'acétone.

Résumons l'action de l'acétone sur les différentes préparations de levure traitées, et examinons d'abord l'extraction des stérols, puis l'extraction du phosphore [*tous les chiffres donnés ci-dessous sont valables pour 20 gr. de levure de panification fraîche (marque SPRINGER)*].

STÉROLS.

L'extraction de la levure fraîche nous donne une quantité de stérols sensiblement nulle, de l'ordre de 1 à 2 mgr. pour 20 gr.

Pour la levure desséchée à l'acétone (levure fraîche traitée par épuisement acétonique prolongé) nous obtenons suivant les expériences de 2,5 à 10 mgr. de stérols totaux.

Si nous considérons maintenant la levure séchée dans le vide sur anhydride phosphorique : seule elle nous donnera 3 mgr. environ, triturée avec du sable 9, avec du sulfate de sodium (sans trituration intermédiaire au cours de l'extraction) de 18 à 47, avec trituration 57 environ, enfin avec la terre d'infusoires nous obtenons de 100 à 128 mgr. (suivant trituration).

Ces résultats sont exprimés schématiquement par les premiers points de la série de courbes que nous donnons plus loin. Pour plus de simplicité nous n'avons représenté que 4 expériences-types et l'on voit très bien sur cette courbe que la proportion de stérols obtenus par l'extraction acétonique est d'autant plus grande que la levure est plus diluée, plus divisée, comme nous disions dans le chapitre précédent.

PHOSPHORE.

En ce qui concerne le phosphore contenu dans les extraits acétoniques, nous avons trouvé des chiffres inférieurs au milligramme, en particulier pour les dernières expériences où il a été dosé respectivement 57 et 114 mgr. de stérols totaux nous avons eu : phosphore : traces et, phosphore : 0,5 mgr. par la technique de COPAUX.

CONCLUSIONS.

La levure fraîche contient presque tous ses stérols sous une forme combinée non entraînable à l'acétone.

La levure sèche nous a donné d'abord 0 gr. 5 de stérols totaux pour 1.000 gr. de levure fraîche, puis jusqu'à 6 gr. 4 à mesure que nous avons perfectionné notre technique.

La quantité de phosphore trouvée est infime, et les stérols extraits par l'acétone semblent être complètement libérés de toute combinaison phosphorée (lécithidique ou autres), et cela d'autant plus que les quelques dixièmes de milligramme de phosphore trouvés venaient souvent d'une deuxième ou d'une troisième extraction, après le départ massif des stérols.

C. — Etude de l'action du chloroforme
après celle de l'acétone.

Quelles qu'aient été les manipulations préalables, le mode et la durée de l'extraction acétonique antérieure, la quantité de stérols totaux extraits par le chloroforme a toujours été comprise entre 0,5 et 2,6 mgr. (pour 20 gr. de levure fraîche traitée à l'acétone) jamais nulle, mais jamais importante.

En résumé la quantité de stérols de levure séchée à l'acétone entraînable par le chloroforme est faible, mais réelle, existante, et ne semblant pas être influencée par les modes d'extraction acétonique préalable.

Sur la série de courbes d'extraction on remarque très nettement une convergence des lignes d'extraction autour du point : stérols : 2 mgr., pour l'extrait chloroformique.

La quantité de phosphore est vraiment infime mais n'est due ni à une impureté des réactifs, ni au matériel, toujours lavé à l'eau distillée.

Quant à l'action du chloroforme sur la levure fraîche (chap. II, § B) elle est aussi très faible : 0 mgr. 5 de stérols.

Le chloroforme enlève peu de stérols et peu de lécithides. Il agit comme s'il existait dans la levure une combinaison transitoire stérols-lécithides.

D. — Pénétration alcoolique.

STÉROLS.

Si nous rassemblons les résultats des extractions alcooliques pratiquées après une extraction à l'acétone et une autre au chloroforme, nous obtenons des chiffres extrêmement variables qui vont régulièrement en décroissant à mesure que l'extraction acétonique produit un meilleur rendement.

Pour la levure séchée seule, nous obtenons les chiffres de 25 à 30 mgr. de stérols totaux ; lorsque nous prenons la levure traitée par le plâtre ou le sulfate de sodium anhydre, les chiffres oscillent pour la plupart entre 10 et 15 ; enfin pour la levure à la terre d'infusoires ils gravitent autour de 8 (en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche).

Plus on extrait de stérols par l'acétone, moins on en extrait par l'alcool, mais il ne nous semble pas que l'on puisse tendre vers la limite ; en effet, nous sommes arrivé, croyons-nous, à extraire presque tous les stérols entraînés par l'acétone, et, d'autre part la diminution des stérols extraits par l'alcool est hors de proportions avec l'accroissement des stérols extraits par l'acétone.

Enfin, comme on peut le voir sur les graphiques, l'alcool sodé complète l'action de l'alcool, et, comme lui, donne d'autant moins de stérols que l'extraction acétonique a été plus forte.

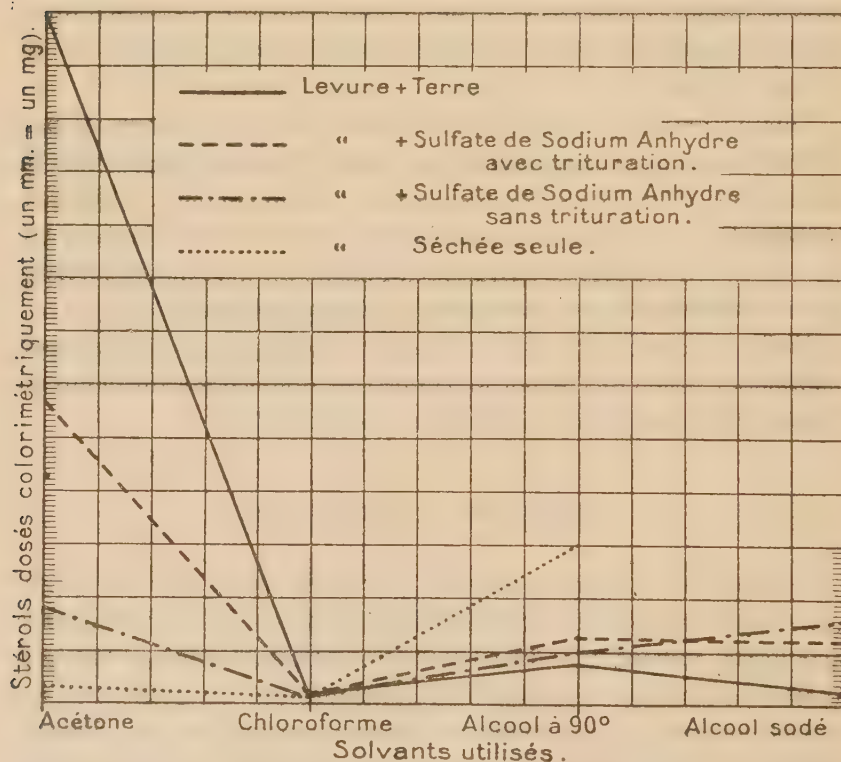
PHOSPHORE ET LÉCITHIDES.

L'alcool est le premier solvant qui enlève des quantités appréciables de phosphore lécithidique. Nous avons dosé les lécithides par pesée, suivant MAC LEAN (68) : les extraits repris par très peu d'éther, nous avons précipité les lécithides par un grand volume d'acétone, nous avons séparé la lécithine par épuisement à l'alcool froid, avons évaporé cet alcool et pesé. D'autre part nous avons déduit les lécithides du phosphore précipité suivant NERKING (voir page 63) et les avons exprimés en lécithide oléopalmitique.

Expériences	Lécithine	Levure fraîche	Levure + SO ₄ Na ₂	Levure + plâtre	Techniques
A alcool avant acétone	calculée	102	84	39	NERKING-MACHEBŒUF
	pesée	103	176	40	MAC LEAN
B alcool après extraction à l'acétone.	calculée	100	220	170	NERKING-MACHEBŒUF
	pesée	120	130	150	MAC LEAN

(Lécithide oléopalmitique en milligrammes pour 20 gr. de levure fraîche pressée.)

Le tableau précédent, où seule la levure au sulfate de sodium fournit des chiffres aberrants, serait en faveur de l'existence dans



Graphique destiné à montrer la teneur en stérol des solutions extractives obtenues, avec les divers solvants employés successivement, pour diverses techniques d'extraction. Avantage de l'extraction à la terre d'infusoire. Importance de l'acétone comme solvant.

la levure d'un lécithide identique ou très voisin de la lécithine (oléopalmitique).

CONCLUSIONS.

L'alcool, seul des trois solvants acétone, chloroforme, alcool, est capable de retirer les lécithides de la levure sèche et il extrait concurremment une certaine proportion de stérols. Malgré cela nous n'avons pu trouver de rapport fixe $\frac{\text{stérols}}{\text{lécithides}}$. Les différents rapports trouvés oscillaient entre 1/6 et 1/10.

Conclusions.

Nous nous sommes préoccupé de retirer le plus possible de stérols de la levure de bière, ou plus modestement d'obtenir le liquide extractif possédant la plus forte teneur en stérols totaux.

Pour cela nous avons recherché successivement le moyen de contrôler cette teneur, les conditions optima d'épuisement, et le solvant le meilleur. Ce sont les conclusions de ces différentes recherches que nous allons exposer.

I. Après une étude critique des différents stérols de la levure, de leurs réactions colorées et de leurs modes de dosage, nous nous sommes arrêté au dosage colorimétrique par l'emploi de la réaction de LIEBERMANN-BÜRCHARD. C'est une des plus sensibles et presque tous les stérols de levure donnent avec elle la coloration verte si caractéristique et si nette pour une bonne lecture colorimétrique.

Cette technique de dosage en bloc des stérols n'a rien de la rigueur d'une méthode pondérale : elle n'est en quelque sorte qu'une commune mesure qui nous a permis d'apprécier dans les extraits de levure la plus ou moins grande quantité de stérols.

II. En recherchant les conditions optima d'épuisement, nous avons trouvé que la levure sèche donnait un rendement supérieur à celui de la levure fraîche. Nous avons essayé d'améliorer encore ce rendement en plasmolysant les cellules, en les traitant par l'alcool sodé, en les emprisonnant dans du sulfate de sodium ou du plâtre en voie de cristallisation, et nous sommes parvenu à la conclusion suivante :

Pour avoir une extraction à peu près complète des stérols de la levure de bière, il est inutile de traiter la levure par l'alcool sodé, de l'emprisonner dans le sulfate de sodium en voie de cristallisation ou de la plasmolyser, il suffit de la dessécher après l'avoir diluée

dans une quantité suffisante d'une matière inerte très fine, comme la terre d'infusoires. De plus il est indispensable de renouveler les surfaces de contact en malaxant de temps à autre le mélange de terre et de levure.

En un mot, les cellules de levure ont une grande tendance à adhérer les unes aux autres et, pour les séparer, il faut non seulement une matière inerte très fine, mais encore une repulvérisation fréquente du mélange ; d'où cette conséquence pratique d'augmenter les surfaces de contact et de les renouveler.

III. Parallèlement aux études physiques précédentes nous avons recherché quel était le solvant le meilleur et le plus pratique, et s'il était utile d'employer plusieurs solvants. Nous avons essayé l'alcool, l'alcool sodé, le chloroforme, l'éther et l'acétone. Ce dernier nous a procuré les résultats les plus intéressants tant au point de vue qualité que quantité des extraits stéroliques obtenus ; aussi nous concluons que :

L'acétone, employé comme solvant unique, permet d'enlever à la levure la majeure partie de ses stérols. Solvant moins général que l'alcool, d'un point d'ébullition moins élevé, l'acétone permet d'extraire les stérols à une température plus basse et de les avoir plus purs et moins altérés.

Enfin nous résumerons dans deux dernières conclusions les questions si complexes des répartitions des stérols dans la cellule de levure et des combinaisons stéroliques.

IV. En ce qui concerne la localisation des stérols dans la cellule de levure, nous dirons simplement que dans nos expériences, tout s'est passé comme si les stérols étaient localisés dans la membrane cellulaire. Deux faits principaux confirment cette hypothèse : l'inactivité de la plasmolyse, malgré son action sur le protoplasme et le noyau, et la nécessité d'augmenter les surfaces de contact de la membrane et des solvants par la séparation des cellules de levure.

V. Sous quel état les stérols se trouvent-ils dans cette membrane ? Vraisemblablement sous forme de combinaisons stérols-lécithides-protéides, combinaisons stables dans la cellule vivante et qui semblent se désintégrer par la dessiccation ou par action de quelques

solvants, coagulants des protéides : acétone, alcool ; une petite partie des stérols reste toutefois engagée dans des combinaisons plus complexes.

Cette hypothèse d'existence non d'esters des stérols mais de combinaisons facilement dissociables est celle qui rend le mieux compte des particularités d'extraction de la levure fraîche et de la levure sèche vis-à-vis de nos solvants.

Signalons enfin que nous n'avons pu trouver de rapport fixe entre les teneurs de la levure en stérols et en lécithides.

Vu : le Président de la thèse,

R. FABRE.

Vu : le Doyen,

P.^r GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERNAL. — Carbon Skeleton of the sterols. *Journ. Soc. Chem. Ind.*, 1932, **51**, 466.
2. AUGUST. H. BERNOULLI. — Eine neue Methode zur kolorimetrischen Bestimmung der Cholesterins. *Helv. Chim. Act.*, 1932, **15**, 274.
3. C. BILLS AND E. HONEYWELL. — Studies on highly purified ergostérol and his esters. *Journ. of Biol. Chem.*, 1928, **80**, 15.
4. C. BILLS AND COX. — Studies on the isomérisation of ergostérol. *Journ. of Biol. Chem.*, 1929, **84**, 455.
5. C. BILLS, N. MASSENGALE AND P. PRICKETT. — Determining the ergostérol content of yeast. *Journ. of Biol. Chem.*, 1930, **87** (2), 259.
6. BÜRCHARD. — Dissertation inaugurale. Rostock, 1889.
7. A. CHEVALLIER ET P. DUBOULOZ. — Sur une technique nouvelle de spectrométrie dans l'ultra violet. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 1076.
8. H. COPAUX. — Procédé rapide pour doser l'acide phosphorique. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, **173**, 656.
9. A. M. COPPING. — The iodine values of the some sterols by Dam's method. *Bioch. Journ.*, 1928, **22**, 1142.
10. E. CRUZ-COKE. — Sur la réaction chimique de la vitamine antirachitique. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **105**, 238.
11. H. DAM. — Jodzahlbestimmungen an Cholesterin. *Biochem. Zeit.*, 1924, **152**, 101-110.
12. H. DAM. — Jodzahlbestimmungen an Cholesterin. *Biochem. Zeit.*, 1925, **158**, 76-80.
13. H. DAM. — Einige Bemerkungen in Bezug auf die Bestimmung von Cholesterin. *Biochem. Zeit.*, 1928, **194**, 177-187.
14. C. G. DAUBNEY AND SMEDLEY, MAC LEAN. — (1) Note on the unsaponifiable matter of yeast fat. *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 868.
15. M. DEJUST, M^{lle} VAN STOLK ET M. DUBREUIL. — Sur la présence de l'ergostérol dans le sang humain. *C. R. Ac. Sc.*, 1928, **187**, 311.
16. L. H. DEJUST ET M^{lle} D. VAN STOLK. — Les isomères de l'ergostérol et ses produits d'hydrogénation. *Revue. Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1932, **14**, 369.
16. DIELS UND KARTENS. — Dehydrierung des Ergosterins. u. s. w. *Lieb. Ann.*, 1930, **478**, 1929.
17. DORIS ABRAMSHON. — Zur Methodologie der modifizierten Salkowskischen Reaktion für quantitative Cholesterinbestimmung in in Blutserum. *Biochem. Zeit.*, 1928, **198**, 233-240.
18. R. FABRE. — Sur l'allophanate de cholestérol et son emploi en chimie biologique. *C. R. Ac. Sc.*, 1926, **183**, 679. *J. P. C.*, 1927, **5** (8) 21-24.

19. R. FABRE. — Contribution à l'étude des stérols de levure. *Amer. Journ. of physiol.*, 1929, 10.
20. R. FABRE et H. SIMONNET. — Les stérols irradiés. Etude physique, chimique et biologique. *Ann. Physiol. Physico. Chim. Biol.*, 1928, 4, 531-569.
21. R. FABRE et H. SIMONNET. — Contribution à l'étude des stérols irradiés. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928 10, 1100-1111.
22. R. FABRE et H. SIMONNET. — L'irradiation des stérols, les rapports des stérols irradiés avec la vitamine antirachitique. *J. P. C.*, 1928, 8 (8), 489-506.
23. R. FABRE et H. SIMONNET. — Etude comparative de la valeur de l'essai physique de l'ergostérol irradié. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, 188, 424.
24. R. FABRE et H. SIMONNET. — Quelques considérations sur l'essai de vérification de l'activité de l'ergostérol irradié. *J. P. C.*, 1929, 9 (8), 331-338.
25. R. FABRE et H. SIMONNET. — Etude physique et biologique du stérol dextrogyre isolé de la levure de bière. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, 188, 1312. *J. P. C.*, 1929, 10 (8), 289-292.
26. R. FABRE et H. SIMONNET. — Contribution à l'étude des phénomènes d'oxydo-réduction. Recherches sur la levure de bière. Influence de la dessiccation. *C. R. Ac. Sc.*, 1930, 191, 1075.
27. R. FABRE, G. BELLOC et H. SIMONNET. — Contribution à l'étude de l'activité biologique des stérols. Etude des stérols de plankton. *C. R. Ac. Sc.*, 1930, 191, 160.
28. CH. FABRY. — Introduction générale à la photométrie. *Edition de la revue d'optique théorique et instrumentale*. 1 vol., 180 p., 1927.
29. M. FRANÇOIS. — Appareil à épuisement continu pour analyse. *J. P. C.*, 1913, 8 (7), 409-410.
30. P. GAUBERT. — Sur les cristaux liquides des éthers-sels de l'ergostérine. *C. R. Ac. Sc.*, 1908, 147, 478.
31. P. GAUBERT. — Sur les cristaux de combinaisons de la cholestérine et de l'ergostérine avec l'urée. *C. R. Ac. Sc.*, 1909, 149, 608.
32. E. GÉRARD. — Sur les cholestérines végétales. *C. R. Ac. Sc.*, 1892, 114, 1544.
33. E. GÉRARD. — Sur les cholestérines des cryptogames. *J. P. C.*, 1895, 1 (6), 601.
34. E. GÉRARD. — Sur les cholestérines des végétaux inférieurs. *C. R. Ac. Sc.*, 1898, 126, 908.
35. L. GOLODETZ. — Neue Reaktionen für Cholesterin und Oxycholesterin. *Chemiker-Zeitung*, 1908, 32, 160.
36. GRIGAUT. — Procédé colorimétrique de dosage de la cholestérine dans l'organisme. *C. R. Soc. Biol.*, 1910, 1, 791-793 et 827-829.
37. GRIGAUT. — Méthode de dosage de la cholestérine dans le sang et les tissus. *C. R. Soc. Biol.*, 1911, 2, 513-515.
38. A. GUILLERMOND, G. MANGENOT et L. PLANTEFOL. — Traité de cytologie végétale, 1 vol., 1195 p., 464 fig. Le François, édit., Paris, 1933.
39. E. HAUSSLER et P. BRAUCHLI. — Une réaction colorée spécifique de l'ergostérol et ses produits de transformation. *Helv. Chim. Acta.*, 1929, 12, 187-193.

40. A. HEIDUSCHKA. — Ueber den Ergosterinegehalt der Hefe. *Zeit. f. Ang. Ch.*, 1928, **41**, 620.
41. A. HEIDUSCHKA UND H. LINDNER. — Ueber den Ergosterinegehalt der Hefe. *Zeit. Physiol. Ch.*, 1929, **181**, 15-23.
42. I. M. HEILBRON E. D. KAMM AND R. A. MORTON. — The absorption spectrum of cholesterol and its biological significance with reference to vitamin D. *Bioch. Journ.*, 1927, **21**, 78-85.
43. I. M. HEILBRON E. D. KAMM AND R. A. MORTON. — The absorption spectra of oils and oil constituents with special reference to provitamin D. *Bioch. Journ.*, 1927, **21**, 1279-1283.
44. I. M. HEILBRON E. D. KAMM AND R. A. MORTON. — Absorption bands of ergosterol and vitamin D. *Nature*, 1927, **130**, 617-618.
45. I. M. HEILBRON, R. A. MORTON AND W. A. SEXTON. — VI. Studies in the sterol group. Part. I. The absorption spectra of some cholesterol derivatives. *Journ. Chem. Soc.*, 1928, **133**, 47-51.
46. I. M. HEILBRON, W. A. SEXTON and F. S. SPRING. — L'existence d'ergostérols isomères. *Journ. of Chem. Soc.*, 1929, **134**, 926-931.
47. I. M. HEILBRON, F. S. SPRING and JOHNSTON. — Dihydroergostérol and the formation of isomérides. *Jour. of Chem. Soc.*, 1929, **134**, 2248.
48. I. M. HEILBRON and F. S. SPRING. — The reaction of iso-ergosterol. *Journ. of Chem. Soc.*, 1929, **134**, 2807.
49. I. M. HEILBRON and F. S. SPRING. — The colour reactions and absorption spectra of sterols in relation to structure. *Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 133.
50. E. H. HENRIK and A. VAN WIJK. — The vitamin D problem. I. The photochemical reaction of ergosterol. *Biochem. Journ.*, 1929, **23**, 1294-1307.
51. HENTSCHEL UND O. BACHMAN. — Gesamtsterin und Ergosterinbestimmungen in der Kuhmilch. *Z. Exper. Med.*, 1930, **71**, 744-754.
52. A. HILGER. — The practice of absorption spectrophotometry. *Adam Hilger, London*, 1932.
53. H. HINGIAIS (M^{me}). — Sur l'application de la méthode de M. Copaux au dosage de petite quantité de phosphore dans les tissus. *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1927, **9**, 540-554.
54. HIRSCHSOHN. — Eine neue Reaktion der Cholesterins. *Maly's Jahresberichte*, 1902, **32**, 545.
55. O. HINSBERG UND E. ROSS. — Nachtrag zur der Behandlung über einige Bestandteile der Hefe. *Zeit. Physiol. Chem.*, 1903, **42**, 189-192.
56. L. HUGOUNENQ et E. COUTURE. — Sur l'activité photochimique de divers stérols et sur la nature de leur action. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, **189**, 47.
57. HUBL. — *Dingl. Polyt. Journ.*, 1884, **253**, 281.
58. E. KAHANE et J. RABATÉ. — Analyse polarimétrique des systèmes ternaires : application au mélange de trois stérols. *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1932, **14**, 808.
59. L. KAHLENBERG. — On some new color reactions of cholesterol. *Journ. Biochem. of Chem.*, 1922, **52**, 217-225.
60. ANTONI KOLOWSKI. — Eine einfache Methode der Isolierung des so-

- nannten Glutathions aus Hefen. *Acta Soc. Bot. Poloniae.*, 1930, **7**, 87.
61. D. KRAFT. — Mutterkorn. *Archive der Pharmacie*, 1908, **4** (4), 1635.
- 61'. M. KUMAGAWA und K. SUTO. — Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverserfbaren Substanzen in tierischen material nebst der kritik einiger gebräuchlichen Methoden *Biochem. Zeit.*, 1908, **8**, 212.
62. W. KUSTER und O. HIRTH. — Ueber des Vorkommen von Ergosterin Rinderblut. *Ber.*, 1928, **61**, 807-811.
63. E. VICTOR LEVINE and EUDICE RICHMAN. — A test to differentiate ergosterol from cholesterol. *Proc. Soc. Esper. Biol. a Med.*, 1930, **27**, 833.
64. C. LIEBERMANN. — Ueber das Oxychinoterpen. *Ber.*, 1885, **18**, 1803.
65. A. MACHEBŒUF. — Dosage du phosphore dans le sang. *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1926, **8**, 464.
66. A. MACHEBŒUF. — Recherches sur les phosphoaminolipides et les stérols du plasma et du sérum sanguin. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, **188**, 109. *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1929, 268-293 et 485-503.
67. H. MACKAY and N. P. SHAW. — « Foodstuffs irradiated with ultra-violet light ». *Lancet*, 8 août 1925, 283.
- 67'. H. MACKAY and N. P. SHAW. — « Irradiation o of foodstuffs with ultra-violet light ». *Lancet*, 2 janvier 1926, 8.
68. HUGH MAC LEAN. — Lecithin and allied substances : The lipins, 1927. *Longmans green and Co. Londres.*
69. R. MASSEMAECKER et H. GRIFFON. — Sur le mécanisme de la réaction de Liebermann-Burchard. Application à la differenciation des stérols d'origine animale ou végétale. *J. P. C.*, 1930, **11** (8), 572.
70. R. MEESEMAECKER. — Nouvelle réaction colorée de l'ergostérol. Différenciation de l'ergostérol et del'ergostérol irradié. *C. R. Ac. Sc.*, 1930, **190**, 216.
71. R. MEESEMAECKER. — Nouvelle réaction de l'ergostérol. Différenciation de l'ergostérol et de l'ergostérol irradié. *C. R. Ac. Sc.*, 1930, **190**, 206.
72. N. O. MELDRUM. — The behaviour of glutathion in yeast. *Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 1421-1427.
73. E. MONTIGNIE. — Etude sur la constitution du cholestérol. *Bull. Soc. Chim.*, 1930, **47**, 467.
74. MIRANDE. — Sur la nature lipoprotéique des stérinoplastes du Lis blanc. *C. R. Ac. Sc.*, 1923.
75. J. NERKING. — Zur Methodik der Lecithinbestimmung. *Biochem. Zeit.*, 1909, **23**, 262-269.
76. C. NEUBERG. — Notiz über die Reaktion von Cholesterin mit methyلفurfuröl. *Zeit. Phys. Chim.*, 1906, **47**, 335-338.
77. A. NEVILLE. — The fat of yeast. *Biochem. Journ.*, 1913, **7**, 341-348.
78. I. V. NIKOLAIEF et S. A. KRASLEOSKAIA. — Sur le mécanisme de la réaction colorée de Salkowski sur le cholestérol. *J. Roussk. Fig. Chim. Obchtch.*, 1928, **60**, 1211.
79. A. OKEY. — A micro method for the estimathion of cholesterol by oxydation of the digitonide. *Journ. of Biol. Chem.*, 1930, **80**, 367.
80. D. OTTOLENGHI. — Sur l'ergostérine. *Atir. Accad. Linct.*, 1905, **14**, 697-705.
81. H. PENAU et G. TANRET. — Sur un stérol dextrogyre de levure, le zymostérol. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, **188**, 1317.

82. H. PENAU et M^{lle} Z. HARDY. — Etude du complexe digitonoside-ergostérol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, **11**, 437.
83. P. PICARD. — Action de l'éther et du chloroforme sur la structure de la cellule végétale. *Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1933.
84. N. W. PIRIE. — The preparation of glutathione from yeast and liver. *Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 51-54.
85. Y. POURBAIX and E. L. KENNAWAY. — The liberation from yeast of substances giving the nitroprusside réaction. *Biochem. Journ.*, 1928, **72**, 1112-1127.
84. F. REINDEL, E. WALTER, H. RAUCH. — Ueber das Ergosterin der Hefe. *Ann. Chem.*, 1927, **452**, 34.
85. F. REINDEL und E. WALTER. — Ueber das Ergosterin der Hefe. *Ann. Chem.*, 1928, **460**, 212-224 ; **466**, 131-147.
86. F. REINDEL. — Ueber das Ergosterin der Hefe. *Ann. Chem.*, 1928, **460**, 131-147.
87. F. REINDEL und A. WEICKMANN. — Zur Kenntnis des Zymosterins. *Ann. Chem.*, 1929, **475**, 86-100 ; 1930, **482**, 120-130.
88. F. REINDEL und K. NIEDERLANDER. — Zur Kenntnis der Bestimmung Von Doppelbindungen in Sterinen. *Ann. Chem.*, 1929, **475**, 147-157.
89. F. REINDEL und A. DETZEL. — Ueber das Ergosterin der Hefe. *Ann. Chem.*, 1929, **475**, 78-76.
90. O. ROSENHEIM. — Note on some sterol colour reactions in their relation to vitamin A. *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 386-388.
91. O. ROSENHEIM. — A specific colour reaction of ergostérol. *Biochem. Journ.*, 1929, **23**, 47.
92. O. ROSENHEIM and KING. — The ring system of sterols and bile acids. *Journ. Soc. Chem. Ind.*, 1932, **51**, 464 et 954 ; 1933, **52**, 10.
93. L. ROUSSEAU. — Déplacement de l'iode d'un iodure par une solution huileuse de cholestérol ou d'ergostérol irradié par la lumière solaire. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, **189**, 37.
94. E. SALKOWSKI. — Die Reaktion des Cholesterin mit Schwefelsäure. *Medizin. Centralbl.*, 1872, **55**, n° 2.
95. A. SHEIGMANN. — Die Lichtempfindlichkeit der Farbstoffe (communication préliminaire). *Koll. Zeit.*, 1928, **45**, 173-175 et 249-250.
96. H. SIMONNET et V. JOURDAIN. — L'ergostérol irradié devant l'expérimentation et la clinique. 1 vol. 228 pages. 12 fig. *Chahine*, éditeur, Paris, 1929.
97. M^{me} M. SORENSEN. — *C. R. des Laboratoires de Calsberg*, 1925 (**15**), n° 10.
98. I. SMEDLEY, MAC LEAN and E. M. THOMAS. — The nature of yeast fat. *Biochem. Journ.*, 1920, **14**, 483-493.
99. I. SMEDLEY MAC LEAN and E. M. THOMAS. — Observations on abnormal iodine values, with special reference to the sterols and resins. *Biochem. Journ.*, 1921, **15**, 319-333.
100. I. SMEDLEY MAC LEAN. — The isolation of a second stérol from yeast fat. *Biochem. Journ.*, 1928, **22**, 22-26.
101. J. W. STEINLE and L. KALENBERG. — A new method for the identification and estimation of cholesterol and certain other compounds. *Journ. of Biol. Chem.*, 1926, **67** (2), 425-467.
102. CH. TANRET. — Sur un nouveau principe immédiat de l'ergot de seigle, l'ergostérine. *J. P. C.*, 1889, **19**, 225.

103. CH. TANRET. — Sur l'ergostérine. *Bull. Soc. Chim.*, 1908, **3** (4), 853.
104. G. TANRET. — Sur la composition chimique de l'ergot de Diss et de l'ergot d'avoine. *C. R. Ac. Sc.*, 1922, **174**, 827.
105. G. TANRET. — De l'ergostérol irradié à la vitamine D cristallisée. *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1933, **15**, 1346.
106. U. TANGE et E. V. M. COLLUM. — Les allophanates de certains stérols. *Journ. Biol. Chem.*, 1928, **76**, 445-456.
107. E. F. TERROINE, R. BONNET, G. KOPP et Z. VECHOT. — La formation des stérols est-elle liée au métabolisme des matières grasses ? *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 678-692.
108. M. TORTELLI und E. JAFFE. — Eine spezifische Farbenreaktion für Trane von Seetieren und ihre Hydrierungsprodukte. *Ch. Ztg.*, 1915, **39**, 14.
109. L. TSCHUGAEFF und A. GASTEFF. — Zur Kenntnis des Cholesterins. I. Anwendung der Xanthogen Reaktion. *Ber.*, 1909, **42** (4), 4631-4634.
110. R. WEITZ. — Formulaire des médicaments nouveaux. *Baillière*, Paris.
111. G. S. WHITBY. — Some new reactions for the detection of sterols. *Biochem. Journ.*, 1923, **57**, 5-12.
112. CH. P. WHITE. — Combinaison de la cholestérine avec les acides gras. *Proc. of Phys. Soc. Journ. of Physiol.*, 1908, **38**, 6.
113. H. WIELAND und M. ASANO. — Zur Kenntnis der Sterine der Hefe I. *Ann. Chem.*, 1929, **473**, 300-313.
114. H. WIELAND und G. GOUCH. — Zur Kenntnis der Sterine der Hefe II. *Ann. Chem.*, 1930, **482**, 36-49.
115. H. WIELAND und V. M. STANLEY. — Zur Kenntnis der Sterine der Hefe III. *Ann. Chem.*, 1931, **489**, 31-42.
116. A. WINDAUS. — Ueber die quantitative Bestimmung des Cholesterins und der Cholesterinester in einigen normalen und pathologischen Nieren. *Zeit. Physiol. Ch.*, 1910, **65**, 110-117.
117. A. WINDAUSS und W. GROSSKOPF. — Ueber das Ergosterin der Hefe. *Zeit. Physiol. Ch.*, 1923, **124**, 8-14.
118. A. WINDAUS und RYGH. — Ueber die Ester des Ergosterins und ihr Verhalten bei der U. V. Bestrahlung. *Nach. Gesel. Wiss. Göttingen Math. Phys. Classe* 1928.
119. A. WINDAUSS und AUHAGEN. — Umlagerungs Versuche am Ergosterin. *Ann. Chem.*, 1929, **472**, 185.
120. A. WINDAUS, AUHAGEN, BERGMANN und BUTTE. — Ueber einige Umsetzungen des Dehydroergosterins und des Ergosterins. *Ann. Chem.*, 1930, **477**, 268.
121. A. WINDAUS, DITHMAR, MURKE und SUCKFÜLL. — Weitere Untersuchungen über die Isomerisierung des Ergosterins und seiner Derivate. *Ann. Chem.*, 1931, **488**, 91.
122. A. WINDAUS und A. LUTTRINGHAUS. — Ueber die Einwirkung von Benzopersäure auf Ergosterin und einige seiner Derivate. *Ann. Chem.*, 1930, **481**, 119-131.
123. A. WINDAUS, VON WERDER und GSCHAUER. — Ueber die Zahl der Kohlenstoffatome im Molekül des Sitosterins und einiger anderer Sterine. *Ber.*, 1932, **65**, 1006.
124. F. WOLKES. — Studies on colour tests for sterols and vitamin A. I. Sterol tests. *Biochem. Journ.*, 1928, **22**, 830-835.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	9
CHAPITRE I. — <i>Les stérols de la levure de bière</i>	13
Les stérols	13
Leurs réactions colorées	29
Leurs dosages	37
CHAPITRE II. — <i>Etude comparative de la solubilisation des stérols contenus dans la levure</i>	49
Techniques employées	50
Action des solvants sur la levure de bière fraîche	51
Action des différents modes de dessiccation sur la levure	55
CHAPITRE III. — <i>Recherches en vue de l'établissement d'une technique d'extraction totale de la levure de bière</i>	59
Techniques employées	62
Essais comparatifs d'extractions des stérols avec des levures fraîches, sèches ou broyées selon A. Supériorité de la technique au sulfate de sodium	66
Comparaison d'extractions stéroliques avec la technique au sulfate de sodium et la méthode de Windaus et Grosskopf	71
Hypothèse sur l'état des cellules de levure pendant l'extraction ; la levure diluée avec de la terre d'infusoires donne une extraction supérieure à celle diluée avec du sulfate de sodium anhydre. Courbes d'extraction	73
Inutilité de la plasmolyse préalable	81
Données en vue de l'établissement d'une technique d'extraction simplifiée : division et broyage	84
CHAPITRE IV. — <i>Recherches sur la distribution des stérols et des lécithides dans la cellule de levure</i>	91
Données de la plasmolyse	94
Action de l'acétone. Conséquences	96
Faiblesse d'action du chloroforme après l'acétone	98
Pénétration alcoolique	99
CONCLUSIONS	103
BIBLIOGRAPHIE	106

